

2m11.3023.3

Université de Montréal

**Un prion permettrait à la levure *Schizosaccharomyces pombe*
de vivre en absence de la calnexine une chaperonne moléculaire essentielle**

par

Philippe Collin

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

Avril, 2002

©Philippe Collin, 2002



W
4
U58
2002
N. 117

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Un prion permettrait à la levure *Schizosaccharomyces pombe*
de vivre en l'absence de la calnexine, un chaperonne moléculaire essentielle

présenté par
Philippe Collin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Pascal Chartrand

Membre : Guy Boileau

Directeur : Luis A. Rokeach

Mémoire accepté le :

RÉSUMÉ

La calnexine est une chaperone moléculaire qui joue un rôle clef dans le repliement et le contrôle de qualité des protéines dans le réticulum endoplasmique. Notre laboratoire a démontré dans le passé que *cnx1*⁺, le gène codant pour l'homologue de la calnexine chez *Schizosaccharomyces pombe*, est essentiel à la viabilité. Lors d'études génétiques récentes sur des mutants de la calnexine, nous avons été en mesure d'isoler des souches viables qui ne contiennent plus *cnx1*⁺ ni dans le génome ni sur plasmide. De plus, nous avons découvert que le mécanisme qui permet la survie en l'absence de *cnx1*⁺ possède des caractéristiques rappelant celles des prions de la levure *S. cerevisiae* : **1)** Le phénotype [*cnx1*⁻] est « infectieux », c'est-à-dire qu'il peut être transmis par transfection d'extraits protéiques traités à la Rnase A, la Dnase I, à la protéinase K et aux UV, dans des cellules de type sauvage qui elles ne sont pas aptes à perdre l'épisode contenant *cnx1*⁺; **2)** Le mécanisme de survie sans la calnexine est bloqué par le traitement des cellules avec de faibles concentrations de l'agent anti-prions guanidine-HCl; **3)** Ce « curing » par 5mM Gu·HCl est réversible, car les cellules redeviennent indépendantes de *cnx1*⁺ quand cet agent est enlevé; **4)** Ce phénomène de survie est dominant car les cellules restent indépendantes de *cnx1*⁺, même après réintroduction de l'épisode contenant *cnx1*⁺, qui est perdu à haute fréquence (~ 70%). Des explications sur ce phénomène sont illustrées dans un modèle que nous avons élaboré et où apparaissent deux éléments principaux : un gène suppresseur *scx1*, pour suppressor of *cnx1*, qui remplace les fonctions essentielles de la calnexine et *cip1*, un répresseur du suppresseur qui possède des propriétés de prion. La conversion de ce répresseur rend la protéine inactive et permet l'expression permanente et constitutive du suppresseur et par conséquent rend *cnx1*⁺ non-essentiel. L'isolation de mutants, lors de criblages génétiques basés sur nos hypothèses, supporte notre modèle.

MOTS CLÉS

Repliement des protéines, Calnexine, Chaperonne moléculaire, Réticulum endoplasmique, Levure, Prion, Phénotype non-Mendelien, Criblage génétique.

ABSTRACT

Calnexin is a molecular chaperone playing key roles in protein folding and its quality control in the endoplasmic reticulum. Our laboratory has previously shown that the gene encoding the calnexin homologue (*cnx1*⁺) is essential for viability in *Schizosaccharomyces pombe*. Recently however, the characterization of *cnx1* mutants led us to the unprecedented finding that a particular mutant induces a mechanism allowing survival of *S. pombe* cells in the absence of this essential chaperone. Several features of the calnexin-less survival mechanism resemble the behavior of yeast prions: **1)** The calnexin-less phenotype is “infectious” as it can be transmitted by protein transfection, using cell extracts treated with RnaseA, DnaseI and UV irradiation to destroy contaminating nucleic acids; **2)** Low concentration of the prion-curing agent guanidine-HCl, blocks the calnexin-less survival mechanism, making cell viability dependent again on calnexin; **3)** the “curing” by Gu·HCl is reversible as cells become independent of Cnx1p when this anti-prion agent is removed; **4)** This phenomenon is dominant over the WT *cnx1*⁺ allele as cells remain independent of Cnx1p after reintroduction of episomal *cnx1*⁺. This unprecedented phenomenon by which *cnx1*⁺ becomes dispensable implies the existence of an inducible pathway that turns-on a suppressor gene that replaces the essential function(s) of Cnx1p. We designate this putative suppressor *scx1* for suppressor of c*nx1*. Our model also predicts the existence of a repressor of *scx1* expression exhibiting prion properties. Conversion of this repressor into its prion form would permanently trigger *scx1* expression and consequently this would render *cnx1*⁺ dispensable. Mutants isolated in ongoing genetic screens based on these hypotheses support to our model.

KEY WORDS

Protein folding, Calnexin, molecular chaperones, Endoplasmic reticulum, Yeast, Prion, Non-Mendelian phenotype, Genetic screen.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Mots clés	iv
Abstract	v
Key words	vi
Liste des figures et tableaux	ix
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xii

INTRODUCTION 1

Le repliement des protéines	1
Le réticulum endoplasmique	2
Les chaperonines	3
Les foldases	5
Les chaperonnes moléculaires	8
La N-glycosylation et son rôle dans le repliement des protéines	13
La famille calnexine/calréticuline : Une nouvelle classe de chaperonnes moléculaires	13
Le contrôle de qualité dans le RE	21
Les maladies génétiques liées au repliement des protéines	24
L'agrégation de protéines, un phénomène pouvant être infectieux : la découverte des prions	26
Les prions de levure	30
[<i>PSI</i> ⁺] : Un modulateur épigénétique de l'efficacité de terminaison de la traduction	31
[<i>URE3</i>], un déterminant non-Mendélien affectant la biosynthèse de l'uracile	33

Critères génétiques et biochimiques pour les prions de levure	36
Implication des chaperonnes moléculaires dans la propagation des prions	37
Le projet	40
ARTICLE	42
Summary	44
Introduction	45
Results	48
Discussion	70
Methods	76
References	83
DISCUSSION ET CONCLUSION	86
Un modèle montrant l'apparition et la survie des cellules <i>cnxI</i>	87
La redondance des prions dans la nature	91
Les prions sont-ils utiles ?	95
Conclusions et perspectives de recherche	98
Rationnel	104
RÉFÉRENCES	105

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

Les figures et tableaux de l'article sont représentés en italique et précédés par la lettre A.

Figure 1. Voie générale du repliement des protéines	4
Figure 2. Les chaperonines	4
Figure 3. Isomérisation des ponts disulfures	7
Figure 4. Isomérisation <i>cis/trans</i> des liens peptidyl-prolyl	7
Figure 5. Mécanisme d'action de BiP, une Hsp70	10
Figure 6. Structure de BiP	10
Figure 7. La translocation dans le RE	12
Figure 8. Structures de calnexine/calréticuline dans différentes espèces	16
Figure 9 Le cycle de la calnexine	16
Figure 10. Modèle de liaison en deux étapes de Cnx1p/Crt avec ses substrats	20
Figure 11. Modèle proposé par notre laboratoire	20
Figure 12. Le contrôle de qualité dans le RE	23
Figure 13. Implication de la calnexine dans les maladies du « repliement »	25
Figure 14. Les deux états de PrP	29
Figure 15. Deux exemples de prions chez <i>S. cerevisiae</i>	35
Figure 16. Rôle de Ure2p	35
Figure 17. Implication de Hsp104p dans la propagation de [<i>PSI</i> ⁺]	39
<i>Tableau A1. Results of plasmid loss assays</i>	49
<i>Figure A1. Leu⁻/Ura⁻ clones are viable cnx1⁻ cells</i>	51,52

<i>Figure A2. $cnx1^+$ cells display temperature-sensitive growth</i>	55
<i>Figure A3. Effect of different stresses on growth of $cnx1^-$ cells</i>	56
<i>Figure A4. $cnx1^-$ cells display a thermosensitive cell-wall defect</i>	58
<i>Figure A5. $cnx1^-$ cells display thermosensitive altered morphology</i>	60
<i>Figure A6. The $Cnx1^-$ phenotype is transmitted by protein transfection and cured by the anti-prion agent Gu.HCl.</i>	67
<i>Figure A7. Model for the hypothetical prion-like survival mechanism in $cnx1^-$ cells.</i>	74,75
Figure 18. Modèle expliquant la notion de barrière des espèces dans la formation de prions	94
Figure 19. L'utilité des PrDs : le modèle de la corde de « bungee »	97
Figure 20. Criblage génétique pour le gène <i>cip1</i> , ayant les propriétés d'un prion	100
Figure 21. Criblage génétique pour le gène <i>scx1</i> , qui complémente $cnx1^+$, dans les cellules $cnx1^-$.	100
Figure 22. Simplification de l'essai « plasmid loss » grâce à un criblage bleu –blanc	103

LISTE DES ABRÉVIATIONS

RE : Réticulum endoplasmique

PrD : « Prion forming domain » ou domaine de formation des prions

ATP : Adénosine triphosphate

UV : Ultra violet

DTT : Dithiothreitol

SDS : Sodium dodecyl sulphate

PAGE : « Polyacrylamide gel electrophoresis » ou électrophorèse sur gel de polyacrylamide

HSP : « Heat shock protein »

GRP : « Glucose regulated protein »

UGGT : UDP-glucose:glycoprotéine glucosyltransférase

BiP : « Binding protein »

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr Luis A. Rokeach, du Département de biochimie de l'Université de Montréal, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir tout appris et pour toujours avoir été disponible.

Merci également à mes collègues de laboratoires, présents et passés, Dr Aram Elagöz, Dr Mario Callejo, Dr Jean-Claude Labbé, Dominique Mayaki, Stéphane Dumont, Antonio Ubach, Dac Hien Vuong, Dr Kexue Huang, Rachida Essahali, Martine Bail, Fadi Hajjar, Pierre-Luc Tanguay, Alexandre Maréchal, Renée Guérin, Pascale Beauregard et Isabelle Ledoux, pour leur aide, leur support et les discussions.

Un merci particulier à Dimitri Sans, un collègue du Département de biochimie, pour son amitié, ses conseils et son support.

Finalement, un merci très particulier à ma mère, à mon père, à mon frère et à Carla Di Falco, pour leur amour, leurs encouragements et leurs efforts pour rendre ma vie la plus facile possible.

INTRODUCTION

LE REPLIEMENT DES PROTÉINES

Le repliement des protéines constitue une des plus grandes quêtes auxquelles fait face la biologie moderne. Tenter de comprendre la relation entre séquence en acides aminés et structure tridimensionnelle correspond à une des énigmes les plus complexes de la science actuelle.

Le repliement des protéines est un phénomène indispensable à la vie. En effet, après leur synthèse, les protéines doivent acquérir leur structure tertiaire, voir quaternaire, adéquate sans quoi elles ne pourront pas accomplir leurs fonctions biologiques. De nombreuses expériences *in vitro*, dont celles de Anfinsen au début des années 1970, ont permis de montrer qu'une protéine dénaturée par des agents chimiques peut retrouver sa structure native après dilution des dénaturants (Anfinsen, 1973). Ceci montre que l'information sur sa structure tridimensionnelle est contenue dans sa structure primaire i.e. sa séquence en acides aminés. Ce phénomène thermodynamique permet donc de passer, en un court laps de temps, d'un polypeptide déplié à la protéine native dont la conformation est thermodynamiquement plus stable. Bien entendu la plupart des études ont été faites sur des petites protéines, comme la ribonucléase, ne possédant qu'un seul domaine ce qui rend l'analyse plus simple. Pour les protéines plus complexes, le temps qui va permettre à la protéine de passer à sa structure native devient plus long et c'est pourquoi ces protéines, de façon générale font appel à l'aide d'autres protéines, que l'on appelle les chaperonnes moléculaires, pour les assister dans leur repliement (Figure 1). Il est possible de définir une chaperonne moléculaire comme une protéine qui interagit avec

une protéine néosynthétisée, permettant une stabilisation thermodynamique de cette dernière, empêchant son agrégation et facilitant un repliement plus ordonné donc plus efficace. Une autre caractéristique clef des chaperonnes moléculaires est que, suite à ce processus de repliement et de stabilisation, elles ne font pas partie de la forme finale de la protéine. Le repliement assisté par les chaperonnes moléculaires est un phénomène qui existe dans tous les compartiments où il y a de la synthèse de protéines, soit dans le cytoplasme, mais aussi dans un compartiment cellulaire, appelé le réticulum endoplasmique (RE).

LE RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE

Le RE est le plus grand compartiment ainsi que le plus abondant dans la cellule. Alors qu'il constitue 10% du volume total de la cellule et contient 50% des membranes cellulaires dans les cellules de sécrétion (revu dans Lippincott-Schwartz, 2000). Le RE est décrit comme un immense réseau complexe de membranes et de citernes qui comprend l'enveloppe nucléaire et qui s'étend dans le cytoplasme. Il s'agit d'une organelle physiologiquement active qui possède plusieurs fonctions spécialisées dont le métabolisme des lipides (synthèse des phospholipides, etc.), la régulation du niveau de calcium cellulaire, mais aussi, comme nous le mentionnions précédemment, le repliement, l'assemblage et la maturation des protéines membranaires et/ou sécrétées. Le RE est divisé en deux régions, la première étant le Réticulum Endoplasmique Rugueux (RER), où l'on retrouve des ribosomes associés aux membranes, qui représente le site de translocation co-translationnelle des protéines, et la deuxième étant le Réticulum

Endoplasmique Lisse (REL), qui est reconnu comme l'endroit de synthèse des phospholipides ainsi que la régulation du gradient cellulaire de calcium. Le RE constitue le point de départ de ce que l'on appelle la voie de sécrétion des protéines. Dans cette organelle, le flux de protéines est immense, ce qui implique l'existence d'une machinerie de repliement qui va faciliter ce trafic et empêcher l'exportation de protéines mal repliées. Il existe trois grandes familles de protéines aidant le repliement des autres protéines : Les chaperonines, les foldases et les chaperonnes moléculaires classiques.

LES CHAPERONINES

Les chaperonines sont de gros complexes de protéines en forme de cylindre présentes dans les bactéries, les mitochondries et les chloroplastes. Les chaperonines Hsp60 (GroEL chez *E. coli* et Cpn60 dans le chloroplaste) sont les premiers complexes protéiques qui ont été découverts comme impliqués dans l'assemblage oligomérique de protéines et le repliement. GroEL contient 14 sous unités identiques assemblées en deux heptamères en forme d'anneau qui lui permettent de réaliser sa fonction de chaperone. Chaque monomère est formé de deux domaines, celui donnant sur l'extérieur, renfermant une pochette permettant la liaison à l'ATP et celui donnant sur l'intérieur de l'anneau, possédant des résidus hydrophobes permettant le contact avec les polypeptides partiellement repliés. Ce même domaine est aussi responsable de la liaison de GroES (Cpn10 dans le chloroplaste), une Hsp10, qui forme un heptamère simple en forme d'anneau lui aussi, et qui est essentiel à l'activité de repliement de GroEL (revu dans Frydman, 2001) (Figure 2).

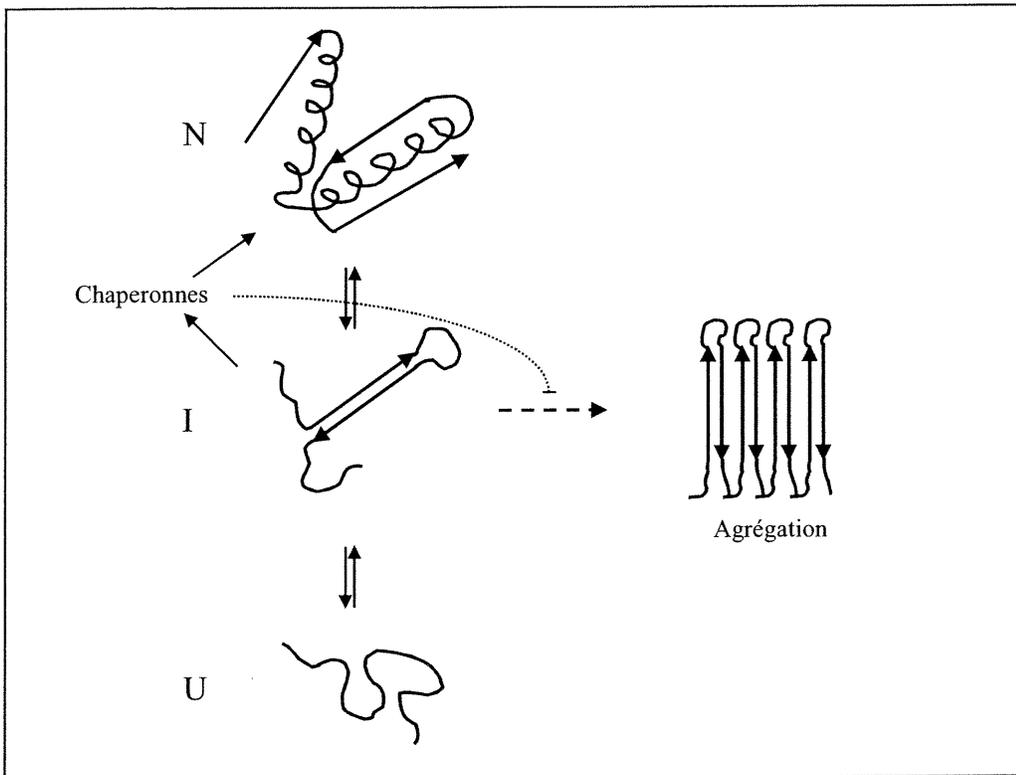


FIGURE 1. Voie générale du repliement des protéines. Une protéine non-repliée (U) et instable subie des changements conformationnels menant à l'apparition d'une forme intermédiaire de la protéine (I) qui possède certaines structures secondaires. Cet intermédiaire est loin d'être stable car beaucoup de résidus sont exposés au solvant. Pour cette raison, la protéine acquiert sa structure native (N), mais dans le cas où l'intermédiaire est dans un cul-de-sac du repliement, il aura tendance à s'agréger puis à être dégradé. De façon générale, les chaperonnes moléculaires empêchent l'intermédiaire de s'agréger et stimulent son repliement de façon ATP-dépendante.

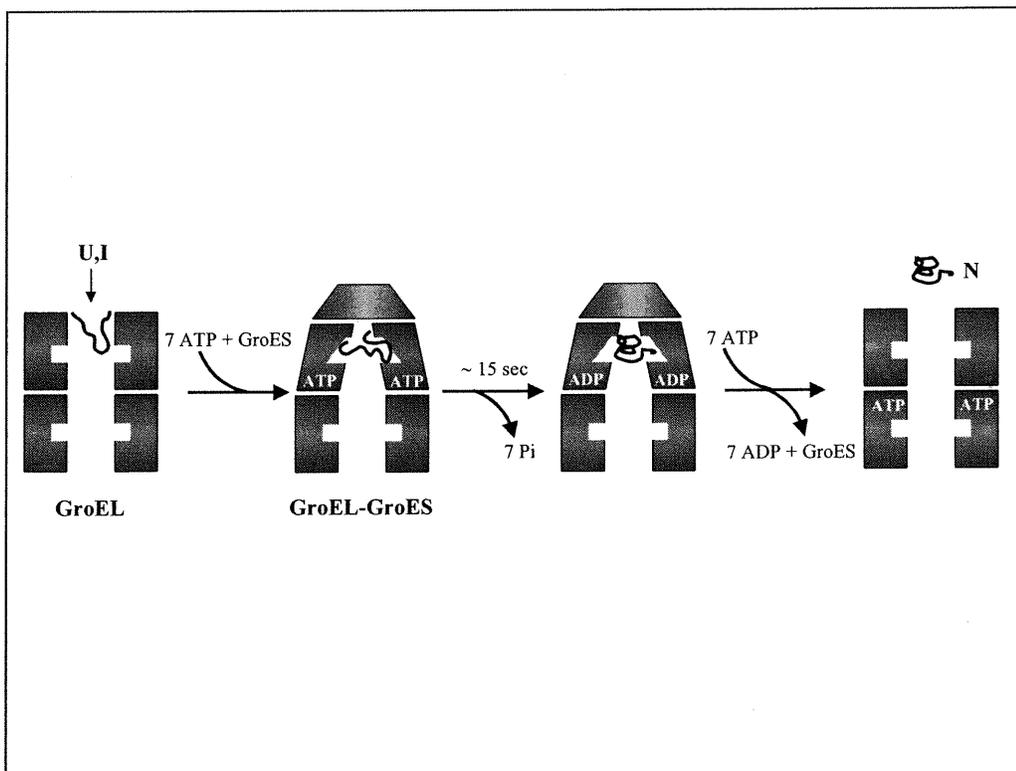


FIGURE 2. Les chaperonnes. Modèle d'action de GroEL et GroES dans le repliement des protéines. Pour des fins de simplification, nous ne faisons apparaître qu'un dimère de dimère de GroEL, mais la stoechiométrie des réactions est celle des heptamères.

Les foldases.

LES FOLDASES

Protéine disulfure isomérase (PDI).

Les études de repliement *in vitro* ont permis de se rendre compte que les ponts disulfure intra- et intermoléculaires servent à stabiliser la structure tertiaire et quaternaire des protéines (revu dans Fewell, 2001). Comme l'oxydation des protéines peut avoir lieu de façon spontanée dans un système aérobique *in vitro*, et étant donné que d'autres études ont montré que le repliement des protéines est beaucoup plus rapide *in vivo* (revu dans Fewell, 2001), ceci suggérait donc que l'oxydation devait être catalysée dans les cellules. Parce que le RE est un compartiment très oxydant, la formation des ponts disulfures est généralement favorisée. Toutefois, la création des ponts disulfures, dans ce milieu oxydatif, se fait de façon aléatoire, en utilisant n'importe quel résidu cystéine disponible. Bien que ça puisse accélérer le repliement des protéines dans certains cas, plus souvent qu'autrement ces arrangements sont mauvais et pour cette raison la cellule se doit d'avoir des composantes dans le RE pour contrôler ces processus. Ce raisonnement a permis d'isoler et d'identifier des protéines capables d'accélérer l'oxydation des ponts disulfures (Goldberger, 1963). Plusieurs protéines à activité disulfure isomérase ont été isolées du RE des mammifères et de la levure *S. cerevisiae*. PDI appartient à la famille des « thiol-disulfide oxydoreductases » et est reconnue comme l'acteur principal dans la catalyse du réarrangement des ponts disulfures. Chez *S. cerevisiae*, PDI a été montrée comme essentielle à la viabilité, ce qui montre qu'elle joue un rôle capital pour la physiologie de cette levure (Freedman, 1994). Le repliement de

protéines néosynthétisées, ou dénaturées et réduites, implique l'oxydation des deux groupes thiol libres du polypeptide suivi de l'isomérisation. L'aspect mécanistique du processus de remaniement des ponts disulfures dans les protéines par PDI reste encore partiellement compris. Toutefois, des études *in vitro* avec des mutants de PDI recombinants ont permis d'élaborer un modèle du mécanisme d'isomérisation (Figure 3). PDI agirait comme oxydant direct, avec un transfert du lien disulfure des cystéines du site actif du motif thioredoxine CXXC de PDI au groupe dithiol libre du substrat avec comme intermédiaire PDI-substrat. Ce qui est moins bien compris à l'heure actuelle c'est comment PDI revient à sa forme active oxydée étant donné que le niveau redox permis par le ratio GSH :GSSG devient loin d'être favorable dans le RE. Des études, par criblage génétique chez la levure, ont permis de répondre partiellement au problème grâce à l'identification de *ERO1* (*ER* Oxydoréductase 1) (Frand, 1998; Pollard, 1998) une protéine impliquée dans le repliement « oxydatif » des protéines notamment grâce à son rôle dans l'oxydation de PDI réduit (Figure 3).

Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomérase (PPI).

De nombreuses études *in vitro* ont permis de comprendre qu'une des étapes limitantes dans le repliement des protéines est l'isomérisation *cis-trans* des résidus prolines (revu dans Galat, 1993; Galat, 1995) (Figure 4). Par exemple, il a été montré que l'efficacité des réactions catalysées par PDI sont améliorées par la présence d'une activité peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase (revu dans Galat, 1993). Les PPI constitue une famille de protéines qui peut être divisée en deux sous-groupes qui réagissent différemment aux drogues immunosuppressives. Les cyclophilines qui lient et qui sont bloquées par la

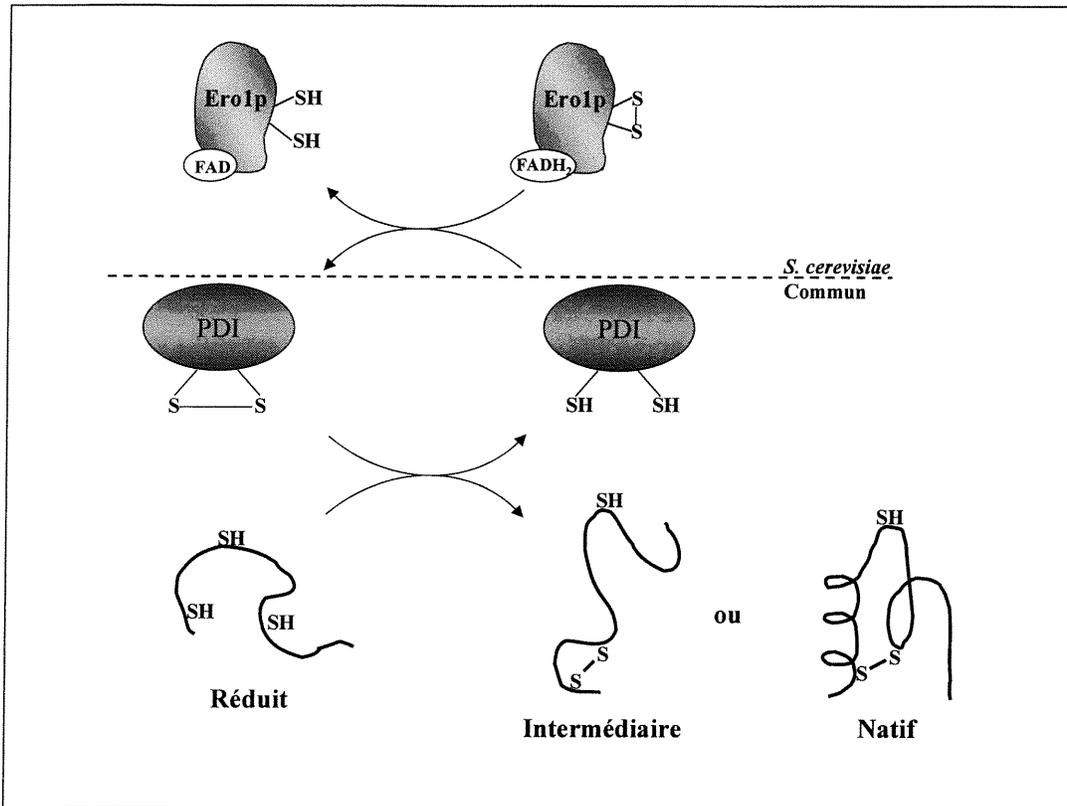


FIGURE 3. Isomérisation des ponts disulfures. PDI est la principale enzyme qui catalyse le réarrangement des ponts disulfures dans le RE augmentant ainsi l'efficacité du repliement des protéines. Avec le potentiel d'oxydoréduction dans le RE, il est encore peu compris comment PDI peut être réactivée en sa forme oxydée. Chez *S. cerevisiae*, a été découvert, grâce à la génétique, Ero1p, une oxydoréductase du RE, qui permet la réactivation de PDI grâce au cofacteur FADH₂.

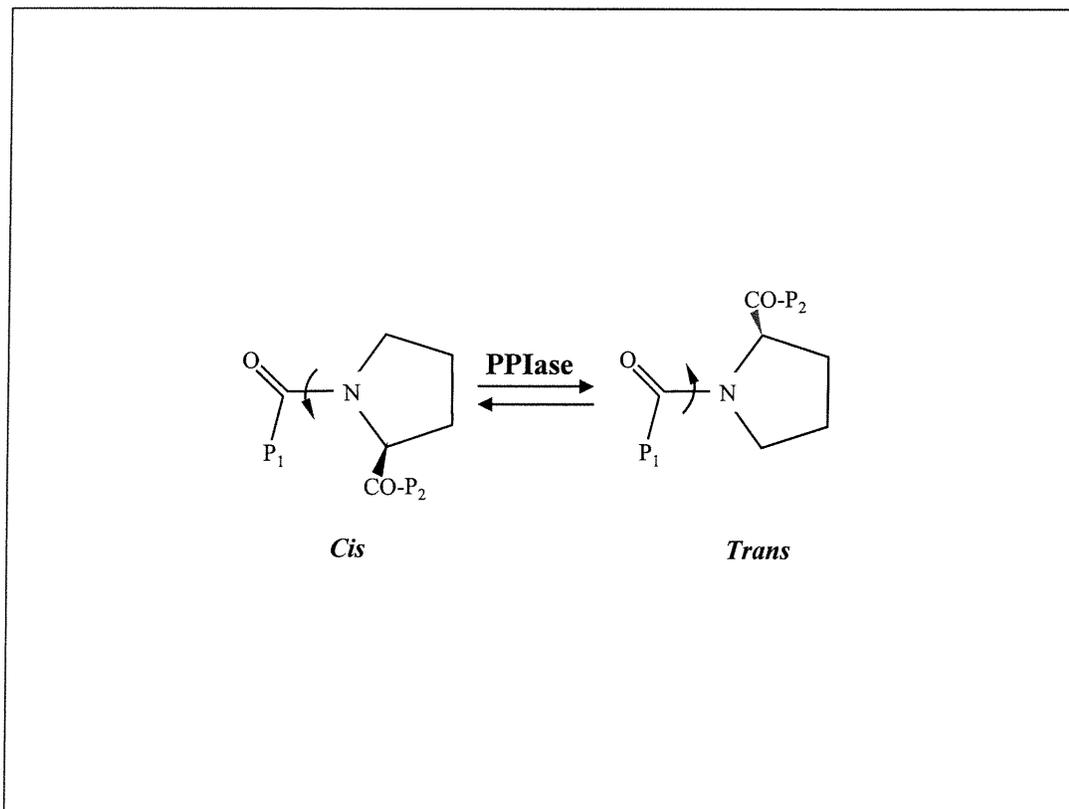


FIGURE 4. Isomérisation cis/trans du lien peptidyl-prolyl. Une des étapes critiques du repliement des protéines est l'isomérisation cis/trans des liens peptidyl-prolyl. Les peptidyl-prolyl-isomérases sont des enzymes qui catalysent l'interconversion des liens peptidyl-prolyl (Xaa-Pro).

cyclosporine A (CsA), et les FK-binding proteins (FKBPs) qui sont sensibles à FK506 ou à la rapamycine (revue dans Galat, 1993; Galat, 1995). Les premières preuves quant à l'existence de l'activité cyclosporine dans le RE ont été mises en évidence quand on a noté que CsA retardait l'exportation de la transferrine (Lodish, 1991) et ralentissait la formation d'hélice du collagène de type I (Steinmann, 1991).

LES CHAPERONNES MOLÉCULAIRES CLASSIQUES

Les chaperonnes moléculaires sont virtuellement présentes dans tous les organismes ainsi que dans tous les compartiments cellulaires. Une des chaperonnes les plus abondantes et la mieux caractérisée à ce jour est BiP (pour « **B**inding protein »), une protéine résidente du RE. BiP fût la première protéine décrite du RE correspondant à la définition de chaperonne moléculaire. En effet, BiP a été identifiée comme une protéine qui facilite l'assemblage oligomérique des immunoglobulines dans le RE des cellules pré-B, par sa liaison aux chaînes lourdes (Haas, 1983), sans, toutefois, faire partie de sa structure finale. BiP fait partie d'une famille de protéines très conservée, les HSP70. Cependant elle possède deux éléments qui la distinguent de ces-dernières. Soient une séquence clivable en N-terminal qui facilite sa translocation dans la lumière du RE, ainsi qu'une séquence à son extrémité C-terminale qui lui empêche d'être exportée hors du RE (Munro, 1987). Cette séquence peut varier selon les organismes dans lesquels se trouve la protéine. Chez les mammifères, cette séquence de rétention dans le RE correspond à KDEL (Munro, 1987), alors que chez *S. cerevisiae* elle correspondra à HDEL (Pelham, 1988) et chez *S. pombe* à ADEL (Pidoux, 1992). La plupart des HSP70 ont un poids

moléculaire apparent de ~70 kilodaltons (kDa) et semblent lier préférentiellement les motifs polypeptidiques qui montrent une alternance entre des résidus aromatiques et des résidus hydrophobes (Flynn, 1991) (Figure 5). Ces protéines sont constituées de deux domaines fonctionnels couplés dont les structures ont été résolues séparément. Le domaine N-terminal de 44 kDa recouvre la fonction ATPasique (Figure 6), alors que le domaine C-terminal de 18 kDa est impliqué dans la liaison des substrats polypeptidiques (Figure 6). Le couplage entre les deux domaines provient du fait que l'hydrolyse de l'ATP va moduler le domaine de liaison aux substrats. En présence d'ATP, les HSP70 lient et libèrent les substrats très rapidement, alors qu'en présence d'ADP, cette dynamique est beaucoup plus lente. Chez *Escherichia coli*, le cycle ATP-ADP de DnaK peut être modulé par d'autres protéines en l'occurrence DnaJ et GrpE. DnaJ est elle-même une chaperonne faisant partie de la famille des HSP40, qui a aussi la propriété de lier DnaK ce qui résulte en une stimulation de son activité ATPasique. GrpE se charge ensuite du relargage rapide de l'ADP pour une autre molécule d'ATP ce qui dissocie le complexe DnaK-substrat. Cette coopération est relativement bien conservée au cours de l'évolution dans la mesure où il est maintenant connu que dans le cytoplasme des eucaryotes il existe aussi ce genre de protéines comme par exemple Hdj1 (*Sis1* chez la levure) et Hdj2 (*Ydj1* chez la levure) (revu dans Fewell, 2001). BiP est une protéine multifonctionnelle impliquée, non seulement dans le repliement des protéines dans le réticulum (Haas, 1983), mais aussi dans d'autres phénomènes cellulaires. Chez *S. cerevisiae*, *KAR2* est essentielle à la viabilité (Rose, 1989) et elle tient son nom du fait qu'elle a été isolée, par complémentation, lors de criblage génétique de mutants déficients (comme *kar2-1*)

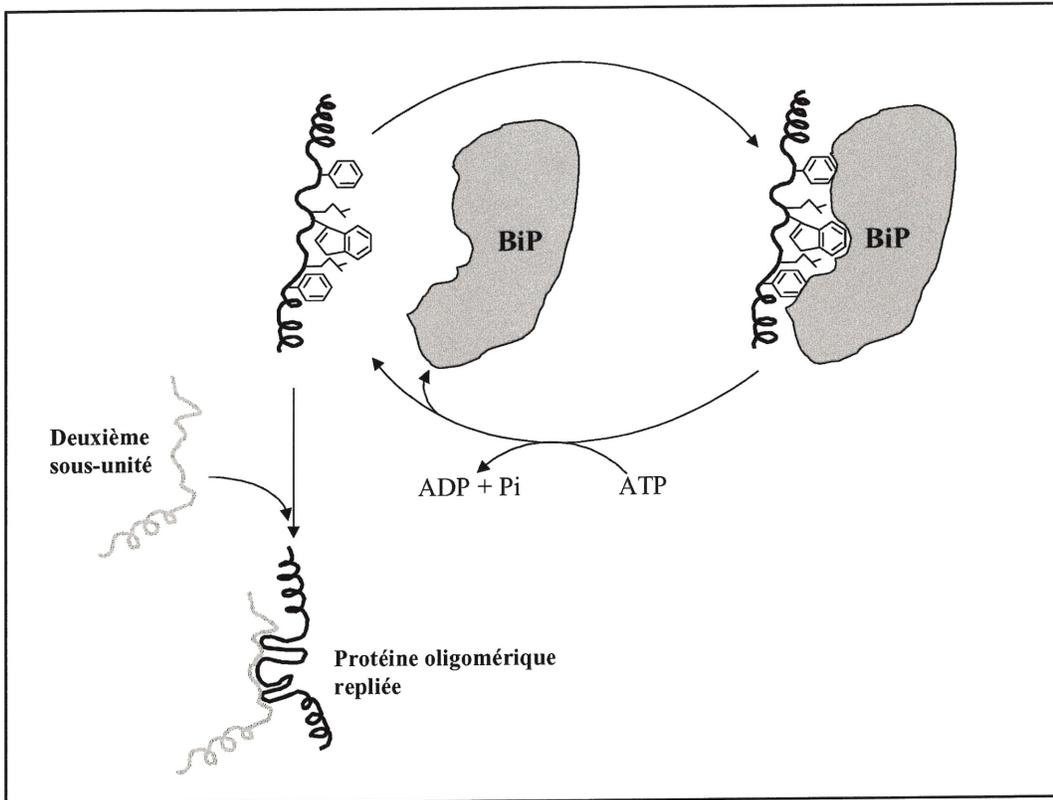


FIGURE 5. Mécanisme d'action de BiP, une Hsp70. BiP a été découvert à cause de son implication dans l'assemblage oligomérique des immunoglobulines. De façon générale, les Hsp70 lient de courtes séquences linéaires contenant des résidus hydrophobes exposés au solvant. Le mécanisme de liaison-déliation est ATP-dépendant. L'hydrolyse de l'ATP induit un changement conformationnel de BiP permettant le repliement du substrat et le relargage de l'ADP pour l'ATP délie le substrat de la chaperonne.

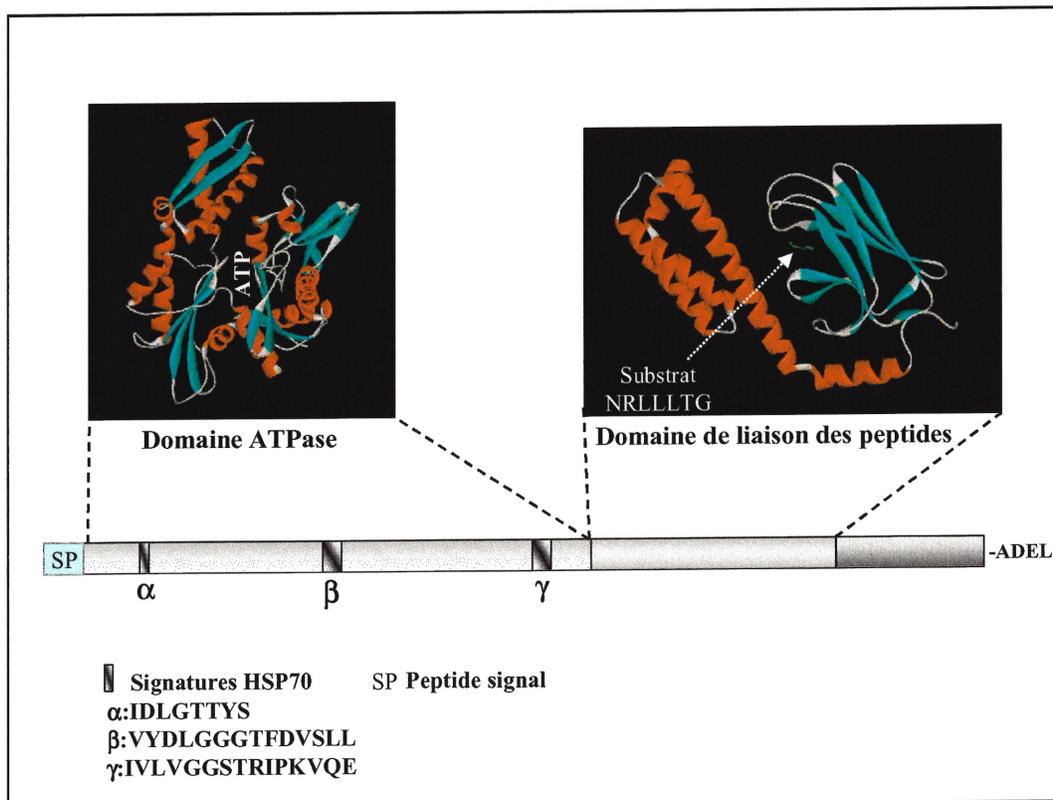


FIGURE 6. BiP. Chaperonne moléculaire membre de la famille très conservée des HSP70. Structure linéaire schématique montrant les deux domaines conservés. Visualisation des structures cristallographiques du domaine ATPase de Hsc70 bovine (Flaherty KM et al., 1990, Nature, 346:623-628) et du domaine de liaison des substrats de DnaK de *E. coli* (Zhu X et al., 1996, Science, 272:1606-1614).

que la carboxypeptidase Y, le facteur alpha, ont permis de montrer son rôle dans la translocation des protéines dans le RE (Vogel, 1990) et, plus récemment, dans la rétrotranslocation qui mène à la dégradation des protéines, dans le cytoplasme, par le protéasome (Brodsky, 1999). Tout ceci fait en sorte que ce membre des HSP70 est considéré comme une vraie protéine « à tout faire » ou « house keeping protein ». Pour réaliser ces multiples fonctions, BiP a besoin de partenaires moléculaires. En effet, dans le phénomène de translocation dans le RE, BiP interagit avec plusieurs protéines de la famille Sec (pour « secretion proteins ») qui se trouvent, entre autres, au niveau du pore de translocation (translocon). Les travaux des laboratoires du Dr Brodsky (revu dans Fewell, 2001) et du Dr Scheckman (Corsi, 1997) ont permis de montrer une interaction très dynamique, chez la levure, entre Kar2p et Sec63p. Sec63p est une des protéines membranaires de type I, formant le pore de translocation avec d'autres protéines telles que Sec61p, Sss1p et Sbh1p. Son interaction avec Kar2p est médiée via son domaine-J (His-Pro-Asp) favorisant, ainsi, non seulement son rapprochement du pore de translocation, mais aussi stimulant son activité ATPasique, ce qui lui permet de véritablement hisser (« molecular ratchet ») les protéines à l'intérieur du RE (Figure 7) (Matlack, 1999). La translocation n'est pas un événement qui implique uniquement les protéines du RE. En effet, de nombreuses études utilisant des mutants thermosensibles ont montré l'importance de chaperonnes cytoplasmiques ou membranaires telles que Hsc70p, Ssa1p, Ssa2p et Ydj1p (revu dans Fewell, 2001). Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, qui est l'organisme modèle que nous utilisons, BiP est essentielle à la viabilité (Pidoux, 1992) ce qui montre une fois de plus qu'elle joue un rôle capital dans la physiologie cellulaire.

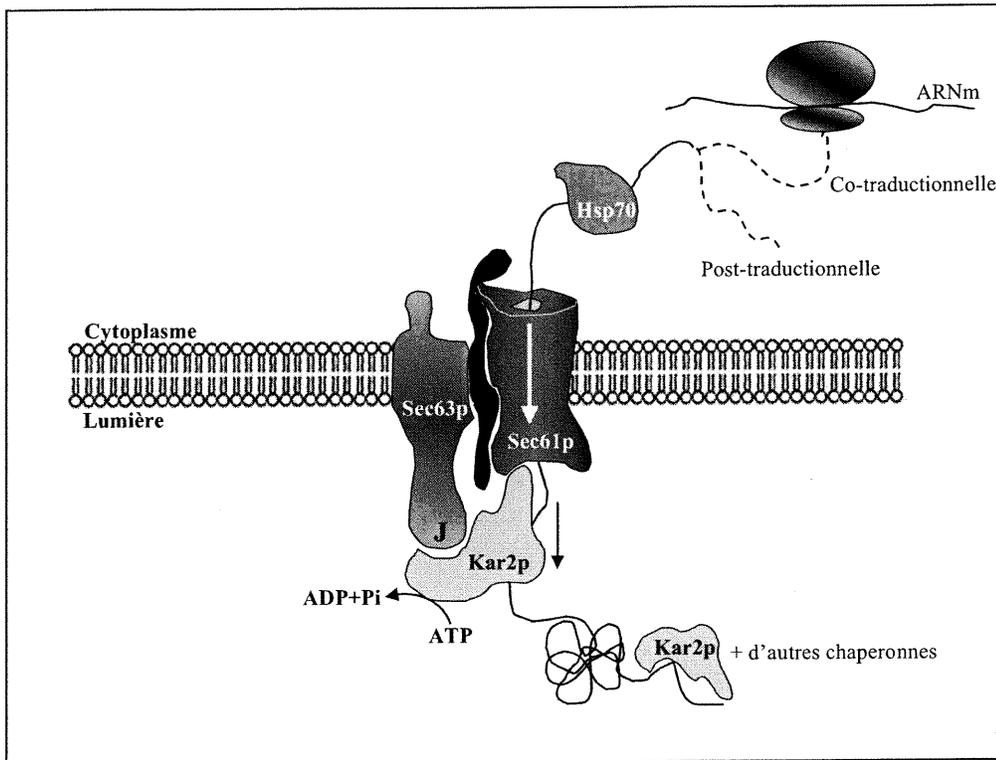


FIGURE 7. La translocation dans le RE.

Les protéines en voie de synthèse ou neosynthétisées sont stabilisées par des facteurs cytoplasmique comme les Hsp70 et les Hsp40 et leur peptide signal permet leurs rapprochement au pore de translocation (translocon). Le translocon est formé de plusieurs protéines qui ont été très bien caractérisées chez *S. cerevisiae*. Parmi celles-ci, on retrouve Sec61p et Sec63p qui agissent de façon concertée avec des facteurs du RE comme Kar2p (l'homologue de BiP) pour permettre à ces polypeptides d'être hissés dans la lumière du RE. Kar2p lie Sec63p qui est capable de stimuler son activité ATPasique via le domaine «J».

LA N-GLYCOSYLATION ET SON RÔLE DANS LE REPLIEMENT

Beaucoup de protéines sécrétées et de la membrane plasmique reçoivent une ou plusieurs glycans pendant leur passage dans le RE. En plus de ses fonctions biologiques multiples (Revu dans Drikamer, 1998), on commence à comprendre l'importance de la N-glycosylation dans le repliement des glycoprotéines. En effet, le premier événement de la N-glycosylation est le transfert de l'arbre polysaccharidique $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ du phospholipide dolichol-P-P, situé à la membrane du RE, à un résidu asparagine accepteur de la protéine. Il est possible de bloquer la synthèse de l'arbre polysaccharidique par une drogue appelée la tunicamycine. L'utilisation d'un tel composé va résulter en une accumulation de protéines mal repliées dans le RE dont seulement une petite partie seront finalement sécrétées mais à très faible vitesse. Un deuxième événement dans la glycosylation est l'excision des glucoses terminaux (« glucose trimming ») par les enzymes glucosidase I et glucosidase II. Quand on bloque cette étape avec des inhibiteurs de ces enzymes, comme la castanospermine ou le 1-deoxynojirimycine, on note que dans certain cas, les glycoprotéines sont mal repliées, s'agrègent et ne sont pas exportées à l'appareil de Golgi.

CALNEXINE/CALRÉTICULINE : UNE NOUVELLE FAMILLE DE CHAPERONNES MOLÉCULAIRES

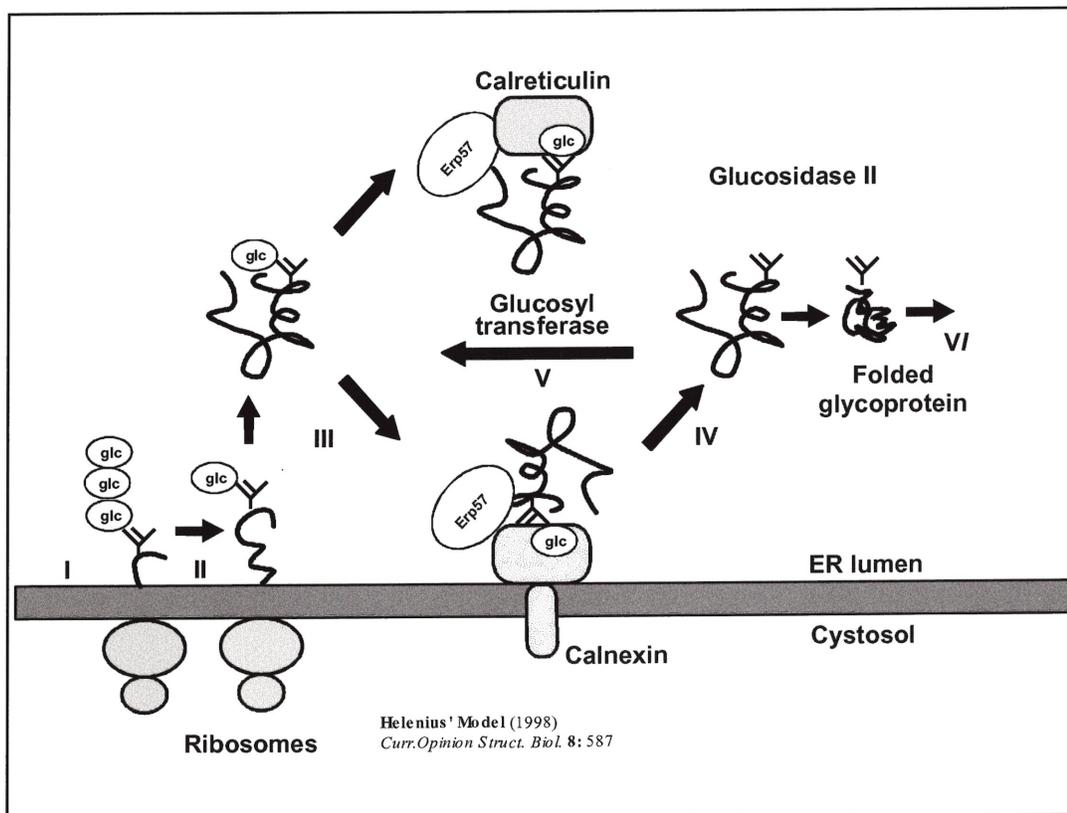
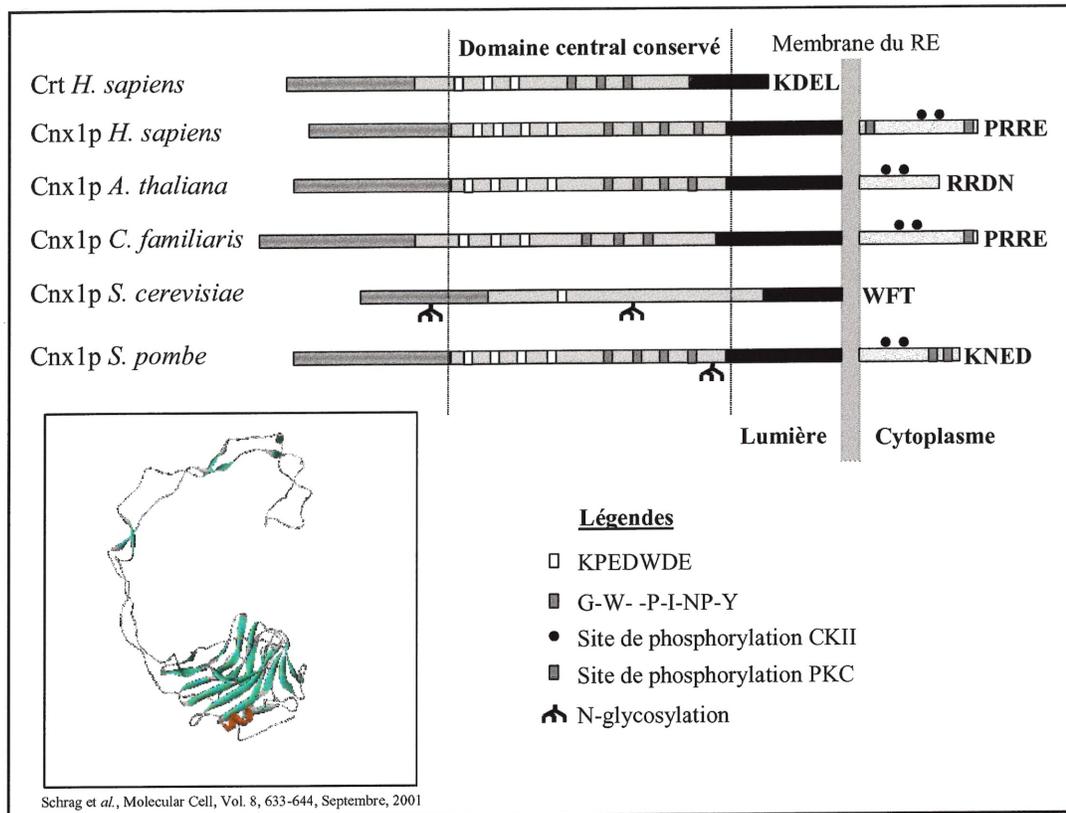
La calnexine a été identifiée initialement en tant qu'une phosphoprotéine transmembranaire de type I, localisée dans le RE (Wada, 1991). La calréticuline, l'homologue soluble de la calnexine, a été isolée à partir de tissus musculaires et a été

définie comme une protéine du réticulum sarcoplasmique impliquée dans le stockage de calcium. À ce jour, nombreux sont les laboratoires qui ont montré que la calnexine et la calréticuline interagissent de façon transitoire avec des protéines naissantes (Hammond, 1994; revu dans Parodi, 2000) et qu'elles sont aussi impliquées dans la rétention dans le RE de complexes multimériques non-assemblés (Degen, 1991). Ceci a donc permis de postuler que la calnexine et son homologue soluble la calréticuline avaient une implication importante dans le repliement et l'assemblage multimérique des protéines dans le RE.

La découverte des différents homologues de calnexine/calréticuline chez les mammifères, les plantes, la grenouille, le nématode ainsi que les champignons, a permis d'établir que ces protéines ont une organisation structurale généralement conservée à travers l'évolution. Cette similarité provient principalement de la portion centrale du domaine luminal, qui contient un nombre variable de copies de motifs répétés hautement conservés appelés motif 1 (I-DPD/EA-KPEDWDD/E) et motif 2 (G-W- - P-I-NP-Y) (Figure 8). Bien que chez les mammifères, les plantes et *S. pombe* on retrouve quatre répétitions des motifs 1 et 2 dans le cas de la calnexine, la levure *S. cerevisiae* est une exception où *Cne1p* possède un seul motif 1 et aucun motif 2 apparent. Il est à noter, d'ailleurs, que *CNE1* n'est pas essentielle à la viabilité (De Virgilio, 1993). Il a été montré chez les mammifères que la calnexine et son homologue soluble la calréticuline étaient capable de lier le calcium à haute affinité (Wada, 1991) et le motif 1 a été cartographié comme le domaine important pour cette fonction. Le domaine central a été montré comme étant important pour la liaison des substrats à la calnexine et à son homologue luminal calréticuline (Vassilakos, 1996).

La partie cytosolique de la calnexine, qui se trouve en C-terminal, varie en taille selon les espèces et va de 1 acide aminé, chez *S. cerevisiae*, à, environ, 100 acides aminés chez les mammifères et les amphibiens. Chez les mammifères, la queue cytosolique contient différents sites de phosphorylation et il a été démontré que la calnexine est phosphorylée par la caséine kinase II (CKII) et par ERK1 et que ces phosphorylations pourraient être impliquées dans la modulation de ses fonctions cellulaires (Roderick; Chevet, 1999) (Figure 8).

Des études pharmacologiques ont permis de visualiser, suite à un traitement des cellules à la tunicamycine, par exemple, une baisse considérable de la liaison entre la calnexine et les protéines naissantes (Hammond, 1994). Avec d'autres études qui ont montrées que les protéines qui liaient la calnexine, liaient aussi la concanavaleine A (conA) (revu dans Williams, 1995), il a été suggéré que la calnexine était une lectine liant spécifiquement les glycoprotéines et faisant partie, avec son homologue luminal, d'une nouvelle classe de chaperonnes moléculaires (revue dans Williams, 1995). L'utilisation d'inhibiteurs des α -glucosidases comme la castanospermine ou la 1-deoxynojirimycine, dans des cultures de cellules mammifères, a eu comme résultat l'abolition de l'interaction entre la calnexine et ses substrats, ce qui suggérait que la calnexine avait une spécificité pour les glycoprotéines monoglucosylées $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Ou, 1993). À la suite de ces observations, le groupe du Dr Helenius a postulé un modèle permettant d'expliquer la fonction de la calnexine et intitulé « le cycle de la calnexine ». Selon ce modèle, les protéines en voie de synthèse sont transloquées dans le RE et sont glycosylées. Ensuite, les glucosidases I et II clivent les deux premiers glucoses ce qui permet alors aux glycoprotéines de lier la calnexine et son homologue luminal. Les glycoprotéines ont



alors deux issues : La première est qu'elles aient acquis leurs structures tridimensionnelle correctement repliées, et dans ce cas elles continueront leur chemin dans la voie de sécrétion. L'autre possibilité est qu'elles soient encore mal repliées. Si tel est le cas, les glycoprotéines pourront alors être à nouveau glucosylées, par l'enzyme l'UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT) qui a été démontré comme un véritable senseur du repliement protéique (Helenius, 1994; revu dans Williams, 1995). Les protéines ainsi reglucosylées pourront alors lier à nouveau la calnexine, le tout dans un cycle (Figure 9). Le mécanisme exact par lequel UGGT distingue les protéines repliées des protéines non-repliées est encore inconnu, mais on peut imaginer un mécanisme, similaire à ceux des chaperonnes moléculaires classiques, qui reconnaîtrait les intermédiaires pas complètement repliés (revue dans Ellgaard, 2001). Ici UGGT et la calnexine agissent de façon concertée pour veiller au bon repliement des glycoprotéines, ce qui ajoute une nouvelle fonction à la calnexine, soit dans le contrôle de qualité.

Bien que ce modèle soit attrayant, il n'en reste pas moins que des laboratoires ont clairement montré que la calnexine ne lie pas uniquement des glycoprotéines. Le laboratoire du Dr Rokeach a cloné la calnexine de *S. pombe*, et a montré qu'elle était essentielle à la viabilité (Jannatipour, 1995). Il a aussi été démontré, par notre laboratoire, que la calnexine pouvait lier des substrats à la suite de traitements à la tunicamycine et à la castanospermine (Jannatipour, 1998). L'utilisation de la levure *S. pombe* dans l'étude des fonctions cellulaires de la calnexine nous semble très appropriée, dans la mesure où, en plus de pouvoir utiliser les puissants outils de génétique classique ou inverse, *S. pombe* possède un système de sécrétion très similaire aux eucaryotes supérieurs notamment dans la maturation des glycoprotéines où on retrouve beaucoup

d'enzymes communes. Des études *in vitro* à l'aide de protéines purifiées ont aussi révélé que la calnexine de *S. pombe* était en mesure de lier les glycanes, mais qu'elle était aussi capable d'empêcher la dénaturation et de promouvoir la renaturation de la luciférase, une protéine non-glycosylée (données non publiées de notre laboratoire). Les études *in vivo* et *in vitro* du groupe du Dr Williams, de l'Université de Toronto, ont aussi contribué à la controverse, dans la mesure où eux aussi obtenaient des résultats similaires, mais chez les mammifères (Ware, 1995). Le groupe du Dr Williams a donc proposé un modèle montrant une liaison en deux étapes entre la calnexine et ses substrats (Figure 10), l'une faisant appel à une interaction via les glycanes, ce qui permet la reconnaissance, et l'autre via une interaction peptide-peptide (Ware, 1995). Comme notre laboratoire, en collaboration avec celui du Dr Parodi, a démontré que l'homologue de UGGT de *S. pombe*, *gpt1*, n'est pas essentiel à la viabilité en conditions standards (Fernandez, 1996), nous en avons donc déduit que la reglucosylation des substrats par Gpt1p n'est pas forcément nécessaire pour permettre la liaison avec Cnx1p. Donc la notion selon laquelle la calnexine lie uniquement les glycoprotéines monoglucosylées, n'est pas validée chez *S. pombe*. De plus, grâce à l'étude de mutants de délétion, notre laboratoire a montré qu'il était possible de déléter la région centrale du domaine luminal de la calnexine, qui semble être importante pour la reconnaissance des glycanes, et d'obtenir des cellules qui étaient, non seulement viables (Elagöz, 1999), mais qui étaient en mesure de sécréter des glycoprotéines actives (Callejo, en préparation). Notre laboratoire a également démontré que la calnexine interagissait avec BiP dans un complexe (Jannatipour, 1998) et que l'interaction persistait même avec les mutants de délétion (Elagöz, 1999). Des données similaires ont été rapportées chez la plante de tabac, où BiP a été isolé dans un complexe

avec la calréticuline (Crofts, 1998). Le concept d'une interaction entre BiP et la calnexine est très intéressant car il met en relief l'existence possible d'une coopération moléculaire entre les différents éléments de la machinerie de repliement dans le RE. Cette hypothèse a été renforcée depuis, quand il a été montré que ERp57 interagissait avec la calnexine chez les mammifères (Tatu, 1997) et que, chez *S. cerevisiae*, des mutants de *kar2* à effet synthétique létal ont été isolés dans des souches $\Delta CNE1$ (Simons, 1998). En tenant compte des observations mentionnée ci-dessus, notre groupe a postulé un modèle basé en partie sur celui du Dr Williams (Figure 11). Une des principales caractéristiques de ce modèle est que nous faisons apparaître l'interaction entre BiP et la calnexine qui favoriserait un rapprochement des substrats à la calnexine via BiP. Nous mentionnons aussi que UGGT fait partie d'une voie secondaire car nous avons montré, en collaboration avec le groupe du Dr Parodi, que *gpt1* n'est pas essentielle en conditions standards chez *S. pombe* (Fernandez, 1996). Parce qu'il a été montré que *gpt1* devient essentielle en conditions de stress extrêmes (Fanchiotti, 1998), nous pouvons penser que l'activité lectine de la calnexine de *S. pombe* est surtout importante en condition de stress.

Récemment, la résolution de la structure cristallographique de la calnexine humaine (Schrag, 2001), a permis de montrer que la calnexine est composée de deux domaines. Une portion globulaire, formée d'un sandwich de feuillettes β antiparallèles, ce qui correspondrait aux côtés N- et C-terminals dans la structure primaire, et un long bras (« hairpin ») de 140 Å qui recouvrirait la partie centrale de la structure primaire. Bien que peu commune chez les lectines classiques, cette organisation structurale a été confirmée par des études par résonance magnétique nucléaire (RMN) sur le domaine central de la calréticuline, qui ont montré le même genre de structure « hairpin » (Ellgard, 2001).

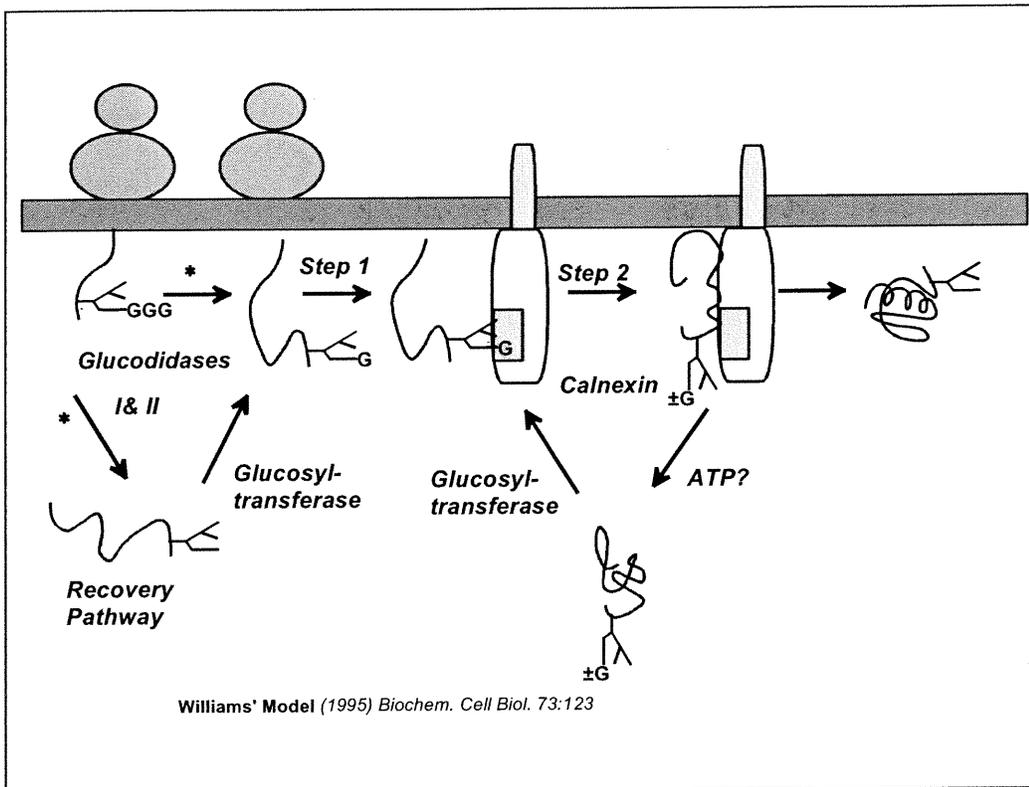


FIGURE 10. Modèle de la liaison en deux étapes de Cnx1p/Crt avec ses substrats. Le groupe du Dr. Williams a montré que la calnexine ne liait pas ses substrats uniquement via l'activité lectine. Ils ont donc suggéré un modèle faisant intervenir des interactions protéine-protéine et où les glycans sont importants uniquement pour la reconnaissance des substrats (Step 1). Une fois reconnus, les glycoprotéines interagissent avec Cnx1p via des interactions protéine-protéine et de façon indépendante à l'état de glycosylation, comme une chaperonne classique (step 2).

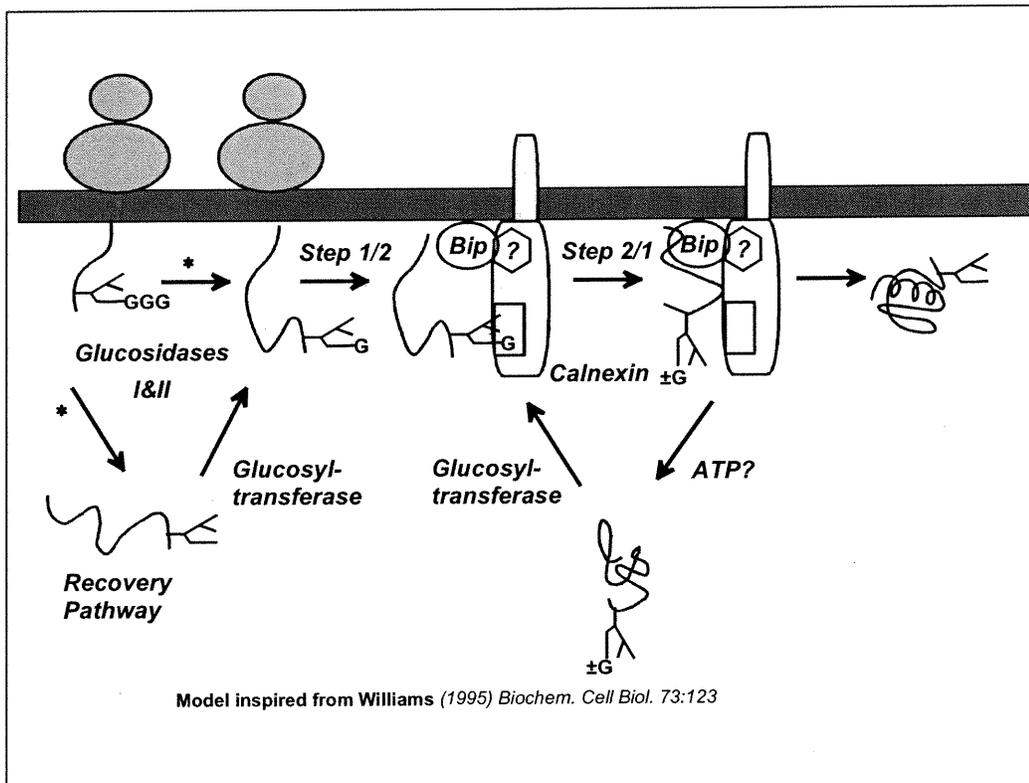


FIGURE 11. Modèle proposé par notre laboratoire. En se basant sur nos études chez *S. pombe*, nous faisons intervenir deux nouveaux éléments dans ce modèle. Le premier étant que la liaison avec Cnx1p peut se faire, dès le début, via des interactions protéine-protéine (step2/1). Cette association pourrait être facilitée par BiP, qui forme un complexe stable avec Cnx1p. La liaison, via les glycans, peut toujours se faire dès le début (1/2) ou suite à suite aux interactions protéine-protéine, mais comme *gpt1* et *glc2* ne sont pas essentiels chez *S. pombe*, nous pensons qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme secondaire, surtout utile en conditions de stress.

Contrairement aux études *in vitro* effectuées antérieurement (Vassilakos, 1998), l'étude des cristaux, en présence de glucose libre, montre que le domaine lectine correspondrait au domaine globulaire (Schrag, 2001) et que le domaine central serait plutôt important pour la liaison du calcium, mais aussi pour la liaison de protéines accessoires, telles que ERp57 (Zapun, 1998).

LE CONTRÔLE DE QUALITÉ DANS LE RE

Le RE est le site où les protéines, qui doivent être ciblées à la membrane plasmique ou être exportées, acquièrent leur structure tertiaire et quaternaire mature. Il existe des mécanismes de contrôle de qualité, dans le RE, qui empêchent les protéines, n'ayant pas été en mesure de se replier et de s'oligomériser correctement, de quitter le RE. Le contrôle de qualité du RE est divisé en deux éléments principaux qui sont la reconnaissance et la rétention des protéines mal repliées, et leur dégradation. De façon générale, toutes les protéines sont sujettes à un contrôle, basé sur la conformation, par les chaperonnes moléculaires qui sont capables de reconnaître les portions hydrophobes exposées à la surface des protéines mal repliées. La rétention de ces protéines dans le RE se fera tant et aussi longtemps que les chaperonnes moléculaires interagiront avec elles, ce qui nous permet d'assurer qu'il n'y aura pas exportation de protéines mal faites ou mal assemblées (Figure 12). Parce qu'il serait risqué d'accumuler pendant trop longtemps des protéines mal repliées dans le RE, il existe aussi un mécanisme permettant de se débarrasser de celles-ci. En effet, après un certain « lapse » de temps, les protéines ne pouvant acquérir leur structure tertiaire et quaternaire adéquate sont dégradées (Figure

12). Initialement, la dégradation des protéines de la voie de sécrétion avait été montrée comme un processus ayant lieu dans le RE, car il était indépendant de l'activité lysosomale et parce qu'il était possible de localiser, aux environs du RE, la dégradation des substrats, par immunofluorescence (revue dans Kopito, 1997). La découverte que la lactacystine, un inhibiteur du protéasome chez les mammifères, inhibait aussi cette dégradation au niveau du RE, a permis d'introduire la notion de dégradation associée au RE (ERAD pour «ER-associated degradation»). Dans cette ERAD, les protéines mal repliées du RE sont reconnues, puis retro-transloquées, grâce à des chaperonnes moléculaires comme BiP, dans le cytoplasme où elles seront dégradées par le protéasome, un complexe multiprotéique en forme cylindrique à activité protéolytique (revue dans Plemper, 1999) (Figure 12).

À l'heure actuelle, plusieurs mécanismes spécifiques de contrôle de qualité ont été découverts dont celui concernant les glycoprotéines. Nous mentionnions plus haut, dans le cadre du cycle de la calnexine, l'existence de UGGT qui agissait comme un senseur du mauvais repliement et qui était responsable de l'ajout d'un glucose sur l'arbre polysaccharidique, ce qui permettait aux protéines mal repliées d'interagir à nouveau avec la calnexine. Pendant plusieurs années, UGGT a été reconnu comme l'élément principal dictant le contrôle de qualité des glycoprotéines, mais on ne pouvait pas vraiment expliquer le pourquoi ni le comment du fait qu'une protéine était condamnée à être dégradée. Des études récentes par le groupe du Dr. Sifers ont permis d'identifier une nouvelle enzyme du RE, la mannosidase I (Mns1), qui est responsable du changement oligosaccharidique au mannose I, qui donne une entité $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ qui agit comme un signal, ciblant ainsi les glycoprotéines mal repliées vers la dégradation par le protéasome

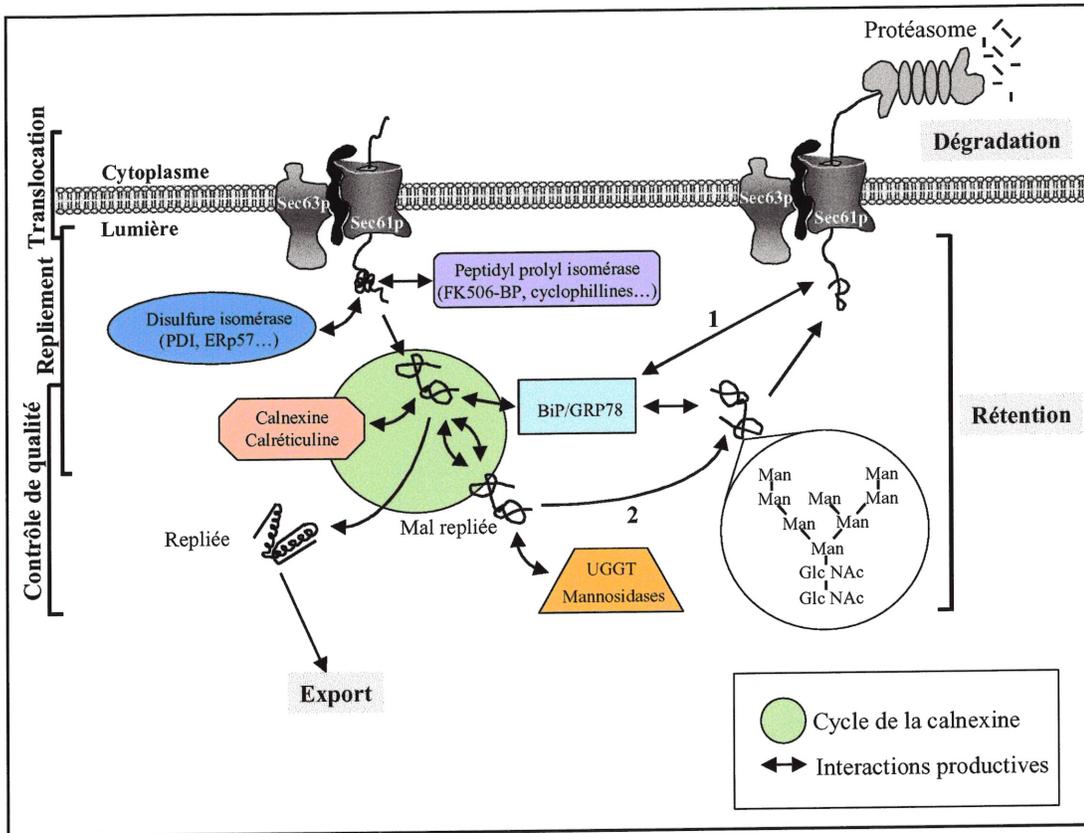


FIGURE 12. Le contrôle de qualité du RE. Les protéines qui pénètrent dans le RE sont repliées grâce à des foldases (PDI, PPI) et des chaperonnes moléculaires classiques (BiP/GRP78...) ou non (Calnexine/Calréticuline). Les protéines seront retenues par calnexine/calréticuline et/ou BiP/GRP78 tant et aussi longtemps qu'elles ne soient pas correctement repliées, après-quoi elles pourront être exportées. Cette rétention peut aussi être réalisée par UGGT, dans le cas où les protéines ne sont pas capables d'atteindre leur structure adéquate, elles seront dégradées dans le cytoplasme par le protéasome. BiP joue un rôle capital en interagissant systématiquement avec ces protéines et en favorisant la retrotranslocation (1). La mannosidase I est aussi reconnue pour reconnaître et cibler les glycoprotéines vers la dégradation (2).

(Liu, 1999). Même si Mns1p est reconnu, à l'heure actuelle, comme un facteur crucial dans le contrôle de qualité des glycoprotéines, les mécanismes permettant la reconnaissance d'une protéine qui est condamnée à être dégradée sont encore à élucider.

LES MALADIES GÉNÉTIQUES RELIÉES AU REPLIEMENT PROTÉIQUE

Plusieurs maladies congénitales peuvent être causées par un mauvais repliement de protéines qui a comme conséquences qu'elles soient retenues dans le RE ou mal ciblées. Ces maladies peuvent être le fruit de mutations dans des gènes codant directement pour des chaperonines et des chaperonnes moléculaires, mais aussi des protéines physiologiquement actives. Dans le cas de gènes codant pour des chaperonnes, il s'agit le plus souvent de mutations dans des protéines n'ayant pas de rôle central qui sont, généralement, déficientes dans l'hydrolyse de l'ATP, comme la chaperonine MKKSp, dans le cas du syndrome de McKusick-Kaufman, ou qui sont mutées dans leur « DnaJ box » comme SACSp, une Hsp90, dans l'ataxie spastique autosomale récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) (revue dans Slavotinek, 2001). Dans le cas de maladies génétiques comme la fibrose kystique et l'emphysème juvénile, il s'agit de mutations causant des défauts dans le repliement, ce qui les rend instables, provoquant ainsi leur rétention et leur dégradation suite au contrôle de qualité dans le RE. Dans le cas de la fibrose kystique, une des mutations les mieux caractérisées est le mutant $\Delta F508$ CFTR du régulateur transmembranaire de conductance de la fibrose kystique (CFTR). Plus de 70% des patients atteints par la fibrose kystique ont cette mutation et elle résulte en une rétention du CFTR dans le RE, ce qui empêche son ciblage à la membrane

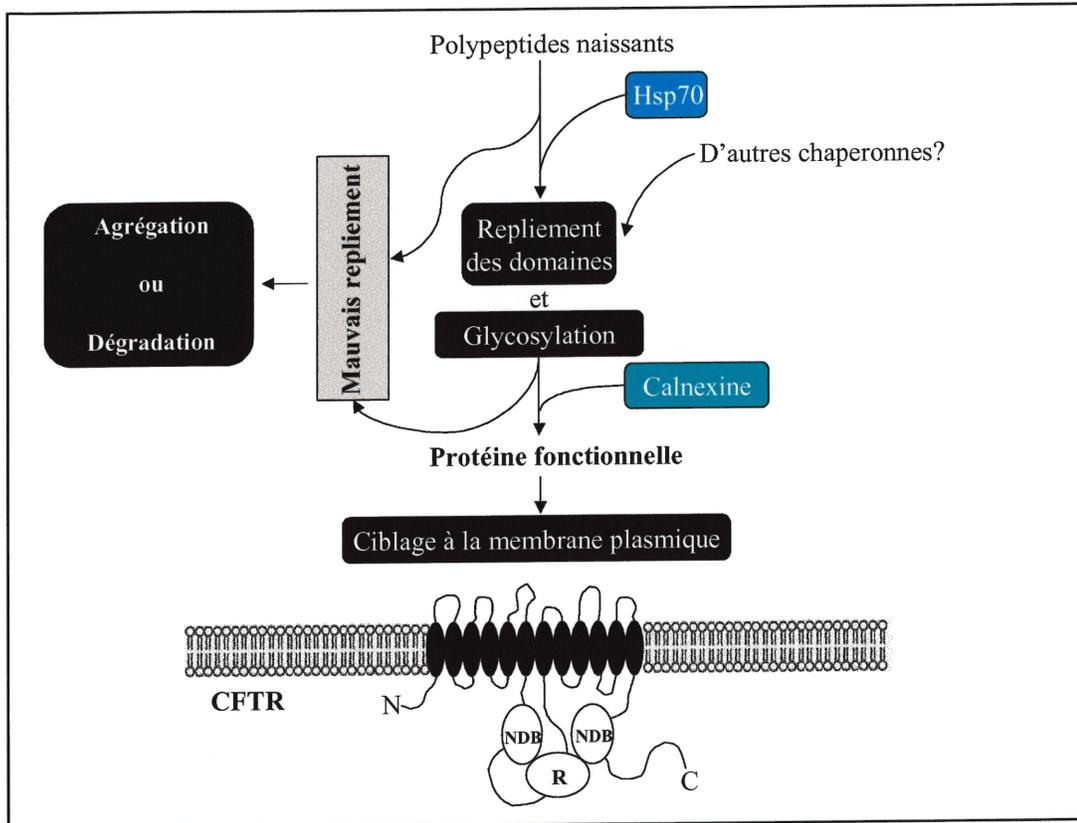


FIGURE 13. Implication de la calnexine dans les maladies du «repliement». L'exemple est celui de CFTR, une protéine de la membrane cellulaire qui, lorsque mutée, ne réussit plus à passer le contrôle de qualité. En effet, le mutant $\Delta 508$ (90% des gens atteints de la fibrose kystique), bien que fonctionnel, est retenu dans le RE par la calnexine, et est, finalement, dégradé par le protéasome. Ceci est un excellent exemple montrant l'importance de la calnexine dans le contrôle de qualité au niveau du RE.

cellulaire, suivie de sa dégradation dans le cytoplasme par le protéasome. Il est intéressant de noter qu'il est possible d'exporter $\Delta F508$ CFTR à la membrane cellulaire en cultivant des cellules en conditions favorisant un meilleur repliement comme la basse température et la présence de glycérol dans les milieux de culture. Ces résultats sont assez intéressants dans la mesure où la mutation $\Delta F508$ ne provoque pas une perte de fonction du CFTR (Sato, 1996). Les observations de Sato et al. nous permettent de mentionner que, bien que le contrôle de qualité soit généralement avantageux pour la cellule, il arrive que ce système de vérification stringent mène parfois à la dégradation de protéines qui pouvaient être sauvées. Il a été montré que la calnexine s'associait avec le CFTR, mais dans le cas de $\Delta F508$ CFTR, l'interaction est beaucoup plus persistante (Pind, 1994), ce qui montre, encore une fois, le rôle de la calnexine dans la rétention de molécules partiellement ou mal repliées et dans le contrôle de qualité de protéine dans le RE (Figure 12). Le même genre de phénomènes a été observé dans le cas de l'emphysème juvénile où un mutant de l' α_1 -antitrypsine est retrouvé en association avec la calnexine puis dégradé.

L'AGRÉGATION DES PROTÉINES, UN PHÉNOMÈNE POUVANT ÊTRE INFECTIEUX : LA DÉCOUVERTE DES PRIONS

L'agrégation des protéines est un phénomène assez répandu, ayant lieu dans des conditions de croissance en stress, par exemple, ou lors de mutations dans les chaînes polypeptidiques. Dans le cas d'expression hétérologue de protéines, il n'est pas rare de

voir une très haute concentration de protéine s'accumuler dans des agrégats nommés les corps d'inclusion.

Toutefois, une des découvertes les plus spectaculaires des dernières années a été, sans aucun doute, le fait que le mauvais repliement protéique pouvait être infectieux. C'est le cas dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles (TSEs) qui sont une famille de maladies neurodégénératives et où l'on retrouve, entre autres, l'encéphalopathie spongiforme bovine (BSE ou syndrome de la vache folle), le « sheep scrapie » et la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CDJs). Les observations de Alper et al. en 1966 qui montraient que le « sheep scrapie » était remarquablement résistant à l'irradiation aux UV par rapport aux virus à ADN ou ARN, ont permis d'avancer l'hypothèse que l'encéphalopathie spongiforme chez le mouton pourrait être transmise sans acide nucléique. Griffith a d'ailleurs secondé cette hypothèse, qui n'était pas très acceptée à cette époque là, en proposant différentes façons selon lesquelles une protéine pouvait être infectieuse sans pour autant détruire le dogme de biologie moléculaire. Une de ces hypothèses était le phénomène de « nucléation » qui se traduisait comme une agrégation massive et irréversible de protéines qui pouvait perpétuer, car ces agrégats avaient la propriété d'induire à nouveau l'agrégation, suite à la division cellulaire (Griffith, 1967). Ce sont les études du groupe du Dr Stanley Prusiner, 15 ans plus tard, qui ont finalement permis la purification de particules infectieuses qui étaient capables de transmettre la maladie à des hamsters. Dans ces fractions aucun acide nucléique n'a été détecté, mais on y a identifié une composante majeure, nommé PrP 27-30, qui était un fragment protéique de 27 à 30 kDa hautement résistant aux protéase (Bolton, 1982; Prusiner, 1982; Prusiner, 1984). Curieusement, ces particules résistantes n'étaient pas

retrouvées dans les cerveaux non-infectés de hamsters. Il a donc été postulé que PrP 27-30 était le premier agent protéique infectieux dépourvu d'acides nucléiques. Cette nouvelle classe d'agent infectieux a été appelée prions (dérivant de « **proteinaceous** » et « **infectious** ») (revu dans Prusiner, 1998). Parce qu'il s'agit d'une protéine codée par la cellule et avec l'identification de la séquence en acides aminés du fragment de 27 à 30 kDa, il a été possible de cloner le gène codant pour le précurseur cellulaire PrP^C (Oesch, 1985; Basler, 1986) qui est exprimé principalement dans les neurones et les lymphocytes (Chesebro, 1985). Chez la souris, le gène *Prn^{sc}* qui avait été démontré comme un gène impliqué dans la modulation du temps d'incubation du « scrapie » (Dickinson, 1968), n'est, en fait, rien d'autre que le gène codant pour l'homologue de PrP (Carlson, 1986). Avec la découverte de mutations dans PrP chez des patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob de type familial, et le fait que des souris « knock out » de PrP n'acquièrent pas la maladie (Bueler, 1996), il a donc été reconnu que PrP jouait un rôle central et essentiel dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles. Le gène de PrP étant exprimé chez les individus normaux, cela implique que si PrP est responsable de la propagation de la maladie, il faut que la protéine existe sous deux états; un normal et un autre infectieux. Bien que le rôle cellulaire de PrP ne soit pas encore très clair, il n'en reste pas moins que des études structurales permettent de mieux comprendre le mécanisme par lequel PrP devient infectieux (revu dans Prusiner, 1997). En effet, il a été montré que les préparations de protéines infectieuses étaient riches en structure secondaire de type feuillets β , alors que la protéine recombinante a plutôt tendance à former des hélices α (Riek, 1996). Le modèle général fait donc part d'une molécule PrP

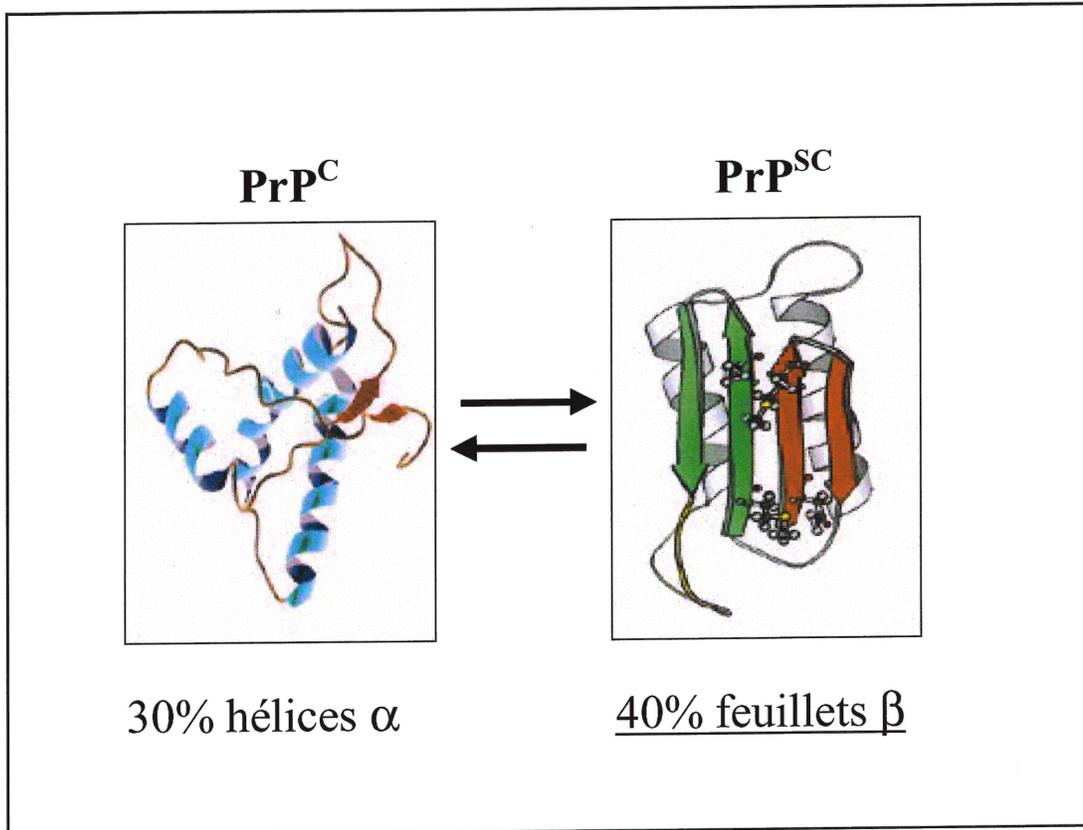


FIGURE 14. Les deux états de PrP. Résolution RMN de PrP sauvage (PrP^C), contenant 30% d'hélices α , qui peut être converti en une protéine nocive, PrP^{SC}, hautement résistante aux protéases, contenant 40% de feuillets β et qui a tendance à s'agréger en fibres amyloïdes.

contenant 30% d'hélices α , désignée PrP^C qui a de très faibles chances d'être convertie spontanément en une forme toxique avec 40% de feuillets β , PrP^{Sc} (Figure 14). Par contre, une fois que PrP^C est exposé aux particules infectieuses, le taux de conversion en PrP^{Sc} deviendrait dramatiquement plus élevé, affectant donc la production de PrP^C (revu dans Prusiner, 1998, Prusiner, 1997, Wetzel, Aggregation and accessory proteins in the pathology of protein-folding diseases, Molecular chaperones in the life of proteins). Le fait que PrP^{Sc} montre une résistance accrue aux protéases, une faible solubilité et la formation apparente de fibres amyloïdiques, est consistant avec l'hypothèse selon laquelle la pathologie proviendrait d'une conversion de PrP^C en PrP^{Sc} suivie d'un phénomène agrégation en fibres amyloïdiques dicté par le titre croissant de PrP^{Sc}.

LES PRIONS DE LEVURE [*URE3*] et [*PSI*⁺]

Bien que la notion de prions ait été introduite chez les mammifères lors d'études sur les maladies neurodégénératives, il n'en reste pas moins qu'au milieu des années 1960 on rapportait déjà deux traits dit « génétiques non-Mendéliens » chez la levure *S. cerevisiae*; Les déterminants [*PSI*⁺] et [*URE3*].

« [PSI⁺] : Un modulateur épigénétique de l'efficacité de terminaison de la traduction. »

[PSI⁺] a été découvert en 1965 lorsque Cox décrivait un élément génétique non-Mendélien qui donnait aux cellules de levure la capacité de supprimer un codon non-sens dans le gène *ADE2* (Patino, 1996) (Figure 15). Des expériences complémentaires ont montré que quand on mute les différents types de tRNA supresseurs dans les cellules [PSI⁺], il y a augmentation considérable du phénomène de suppression de l'arrêt de la traduction (revu dans Serio, 1999). Cette allosuppression par [PSI⁺] n'est pas restreinte aux tRNA supresseurs. En effet, ce genre de suppression existe également avec plusieurs mutants de protéines ribosomales ou de facteurs de terminaison de la traduction comme *SUP35* et *SUP45*, qui peuvent aussi amener la suppression de codons non-sens (revu dans Serio, 1999). [PSI⁺] agit donc comme un allosuppresseur omnipuissant et est décrit comme un facteur « d'infidélité de traduction ». Dans des croisements génétiques, [PSI⁺] est dominant, c'est-à-dire que quand des haploïdes [PSI⁺] et [*psi*⁻] sont conjugués, le diploïde est toujours [PSI⁺]. La génétique classique nous dirait que ce diploïde serait hétérozygote, mais de façon assez surprenante, il a été montré que les quatre spores résultant de ce diploïde sont [PSI⁺] ce qui fait de [PSI⁺] un trait dominant transmis de façon non-Mendélienne. Cette distribution particulière du trait a été expliquée par le fait que [PSI⁺] était localisé dans le cytoplasme car il pouvait être transmis par cytoduction, soit une conjugaison en l'absence de fusion des noyaux (Revu dans Wickner, 1996; Wickner, 1999; Serio, 1999). Par la suite, une série d'expériences ont permis de distinguer [PSI⁺] des différents acides nucléiques cytoplasmiques tels que l'ADN

mitochondrial, les « killer virus » et les ADN nucléaires extrachromosomiques 2μ et 3μ (revu dans Wickner, 1996). Il est important de noter que l'état $[PSI^+]$ et l'état $[psi^-]$ ne sont pas absolument irréversibles, c'est-à-dire qu'une souche $[PSI^+]$ peut être convertie, à faible fréquence, en $[psi^-]$ et vice versa (Cox, 1965). La conversion de $[PSI^+]$ à $[psi^-]$ a été définie comme le « curing » et il est possible d'observer une augmentation considérable de la fréquence de ce « curing » lorsque les cellules $[PSI^+]$ sont cultivées en milieux hyperosmotiques (Singh, 1979) ou en présence d'agents non-mutagéniques tels que 5mM de chlorure de guanidium (Gu-HCl) (Tuite 1981). À l'état $[psi^-]$, ces cellules peuvent être converties à nouveau en $[PSI^+]$ montrant que le « curing » est réversible (Tuite 1981). Plusieurs groupes ont montré une corrélation entre $[PSI^+]$ et le facteur nucléaire *SUP35*, notamment quand des mutants donnant une perte partielle de fonction de *SUP35* montraient un effet identique à $[PSI^+]$ (revu dans Serio, 2000). Chernoff et collaborateurs ont montré qu'une surexpression de *SUP35* donnait lieu au phénomène de suppression de non-sens $[PSI^+]$ (Chernoff, 1988; Chernoff, 1993). Mais les observations les plus frappantes furent sans contredit celles des mêmes auteurs (Chernoff et al.) qui ont montré que cette suppression persistait suite à la perte de la copie épisomique de *SUP35* (Chernoff, 1993), d'où la relation très proche entre *SUP35* et $[PSI^+]$. Sup35p, comme nous le disions précédemment, est un facteur impliqué dans la terminaison de la traduction et il possède trois principaux domaines. Une région N-terminale (N aa 1-124) riche en glutamine et asparagine qui possède cinq répétitions non-parfaites du nonapeptide QGGYQ(Q)QYNP. Une région centrale (M aa 124-253) contenant beaucoup de résidus chargés. Les domaines NM ne sont pas essentiels à la viabilité, malgré qu'ils soient conservés dans toutes les espèces où Sup35 a été cloné sauf *S. pombe* (revu dans

Serio et al. 1999). Le domaine C-terminal (C aa 254-685), lui, est très conservé et ressemble au facteur d'élongation de la traduction EF-1 α (Figure 15). C'est en 1994 que sup35p a été identifié comme le facteur [PSI⁺], grâce aux études de Ter-Avanesyan et al. et Doel et al. (revu dans Serio, 1999) qui ont montré, par des études de délétions, que le domaine N était indispensable à la propagation de [PSI⁺].

[URE3], un déterminant non-Mendélien affectant la biosynthèse de l'uracile.

L'aspartate carbamylase, Ure2p, catalyse la première étape dans la synthèse de l'uracile et son produit est l'ureidosuccinate (USA). Normalement, dans un milieu de culture contenant des sources riches en azote, les cellules n'assimilent pas l'USA. Ceci est dû au fait que Ure2p bloque, via le facteur de transcription Gln3p, l'activité de Dal5p, un transporteur d'USA et d'allantoate (Figure 16). Lacroute, en 1971 (Lacroute, 1971), a isolé des mutants, qu'il a appelé *ure*, qui étaient capables d'utiliser l'USA (Figure 16). La plupart des ces mutants étaient récessifs sauf un, qui était dominant et montrait une ségrégation irrégulière lors de la méiose. Comme des croisements génétiques entre des souches [URE3] et [*ure-o*] donnaient toujours des diploïdes [URE3] et que le trait USA⁺ était transmissible par transfert de cytoplasme (ou cytoduction) (Aigle, 1975), [URE3] a donc été considéré comme un caractère génétique non-Mendélien. Cette histoire fut oubliée jusqu'au début des années 1990, quand Reed Wickner remarqua le « curing » de [URE3] en présence de 5mM Gu·HCl, et que ce « curing » était réversible (Wickner, 1994). Comme des mutations dans *ure2* donnaient le phénotype [URE3] (Aigle, 1975), il a montré qu'une surproduction de Ure2p résultait en une augmentation de 20-200 fois la

fréquence d'apparition de [URE3] (Wickner, 1994). En montrant qu'une délétion de *ure2* donnait [URE3] mais empêchait sa propagation, Wickner a donc avancé le scénario d'un prion pour les états [URE3] et [PSI⁺] où ils sont propagés grâce à la conversion en une forme alternative de Ure2p et Sup35p. Ure2p est formé de deux régions principales : Un petit domaine N-terminal (aa 1-80) et un grand domaine C-terminal impliqué dans la régulation de la fonction et qui possède une homologie avec la glutathion-S-transférase (Figure 15). Bien que la surproduction de Ure2p permette une augmentation considérable de la fréquence d'apparition de [URE3], il a été montré que le domaine N-terminal était suffisant pour augmenter jusqu'à 10000 fois plus que la fréquence de conversion spontanée (Masison, 1995). Dans ces mêmes études, il a aussi été montré que des fragments de Ure2p, provenant de cellules [URE3], étaient très résistants à la protéinase K. Quand on examine de plus près la séquence, on se rend compte, tout comme dans le cas de Sup35p, qu'il s'agit d'une région riche en asparagine (40%). Des études de délétions dans cette région ont été effectuées et il a été montré qu'elles réduisaient le taux d'apparition de phénotype [URE3] en diminuant l'agrégation de Ure2p (Maddelein, 1999).

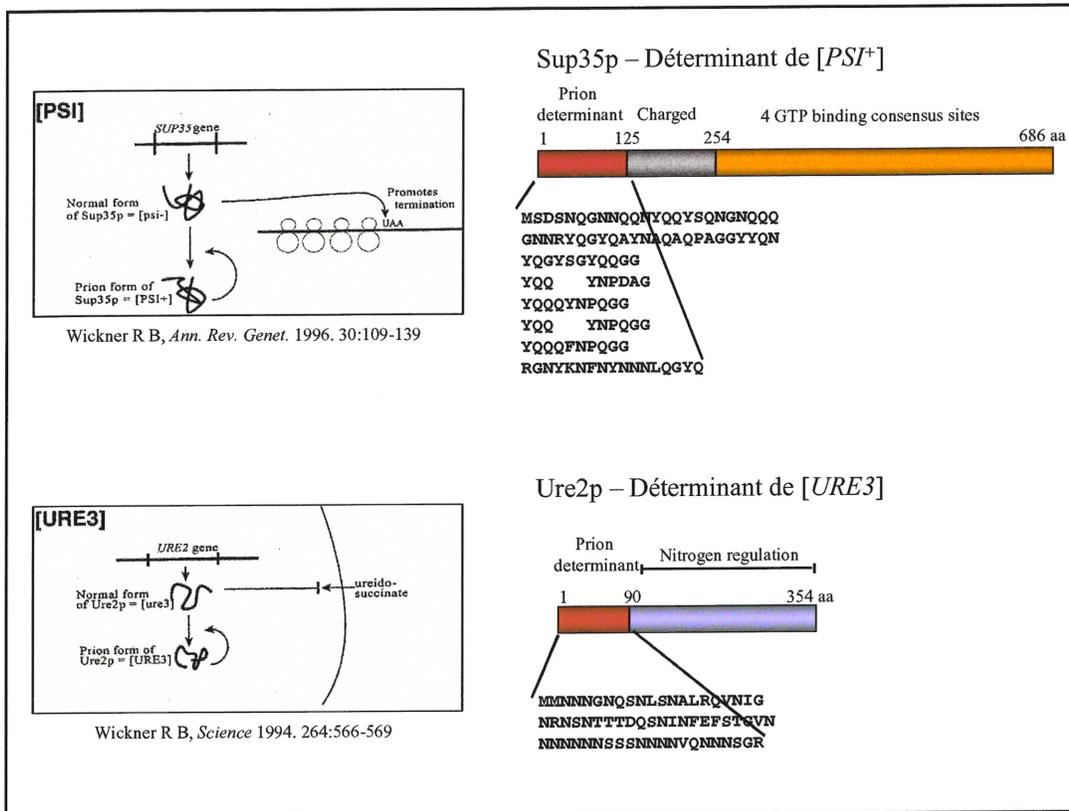
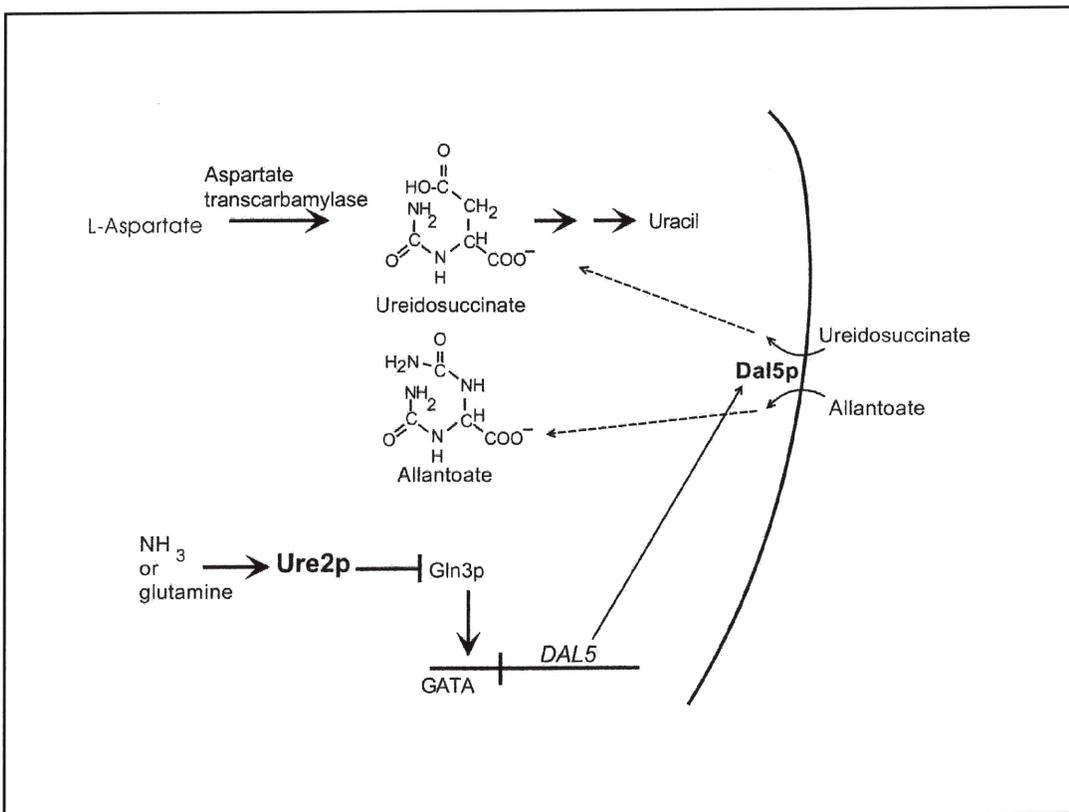


FIGURE 15. Deux exemples de prions chez *S. cerevisiae*. [URE3], la forme prion de Ure2p, affectant le catabolisme de l'azote, possède un domaine N-term, riche en asparagines, responsable de la propagation de [URE3] et un domaine fonctionnel en C-term homologue à GST. [PSI⁺], la forme prion de Sup35p, un facteur de terminaison de la traduction. Sup35p possède trois régions principales dont le domaine N-term, riche en asparagines et en glutamines favorisant son agrégation et donc la propagation de [PSI⁺].



CRITÈRES GÉNÉTIQUES ET BIOCHIMIQUES DES PRIONS DE LEVURE

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le Dr. Wickner a proposé le parallèle entre le prion des mammifères et les éléments extra chromosomiques [*PSI*⁺] et [*URE3*] de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. D'où l'idée d'un changement conformationnel permettant à ces derniers d'être propager de façon autonome grâce à des formes alternatives et non-fonctionnelles de Sup35p et Ure2p (Wickner, 1994). Dans ces études, il a aussi été proposé un nombre de critères selon lesquels il est possible de reconnaître des prions dans les microorganismes, et les différencier des replicons comme les virus et les plasmides (revu dans Wickner, 1996; Wickner, 1999).

(I) *La curabilité réversible*- Si un prion est éliminé de façon spontanée ou par des traitements chimiques non-mutagéniques, alors il est possible que ce prion réapparaisse à nouveau de façon spontanée dans ces mêmes cellules.

(II) *Une surproduction de la protéine sauvage dans la conformation non-prionique induit l'apparition du prion*- La formation initiale du prion provient de la conversion spontanée de sa forme native à sa forme alternative. Il est donc attendu qu'une surproduction de cette protéine va augmenter le taux de molécules converties et ainsi faciliter la propagation du prion dans la cellule. La propagation du prion est traduite par une agrégation de la protéine, suite à sa conversion, via le domaine de propagation du prion et il a, d'ailleurs, déjà été montré que la surproduction de ce fragment était suffisant pour provoquer l'apparition du prion.

(III) *La relation entre les phénotypes de la présence du prion et le gène codant pour la protéine*- Comme le prion est propagé grâce à la conversion structurale de la protéine, le

gène est donc nécessaire à la propagation du prion. Le phénotype du prion provient de la délétion fonctionnelle du gène, et une délétion génétique du gène donne le phénotype mais empêche sa propagation. Les mutants donnant le phénotype «prion» sont généralement des mutations qui engendrent une perte d'activité de la protéine et qui sont transmises de façon Mendélienne.

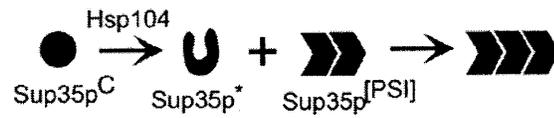
(IV) *L'agrégation et la résistance à la protéinase K des protéines dans leur forme prion-*
Même s'il s'agit de données plus récentes qui sont encore incertaines dans plusieurs cas, il n'en reste pas moins qu'il a été montré *in vivo* et *in vitro* que Sup35p et Ure2p s'agrégeaient dans des cellules [*PSI⁺*] et [*URE3*] et qu'elles montraient une résistance accrue à la protéinase K (Paushkin, 1997; revu dans Wickner, 1999).

IMPLICATION DES CHAPERONNES MOLÉCULAIRES DANS LA PROPAGATION DES PRIONS

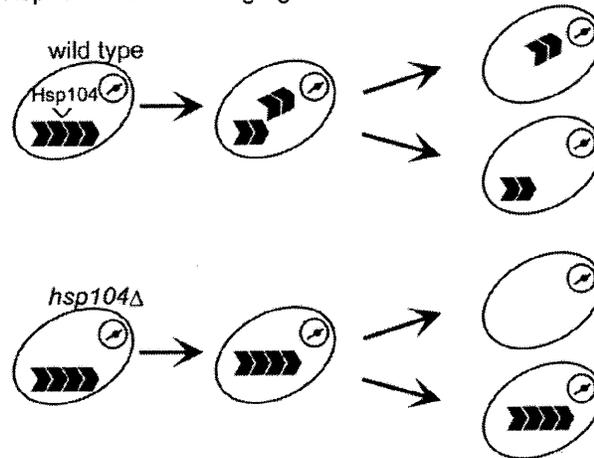
Par définition, les prions sont des protéines qui subissent un changement de conformation ce qui mène à leur agrégation en particules infectieuses qui sont insolubles et résistantes aux protéases. Bien qu'il existe un certain nombre de preuves quant à ce changement de conformation, il n'en reste pas moins qu'il est encore très peu compris comment une particule de protéines agrégées peut induire des changements de conformation dans des protéines « saines », c'est-à-dire dans leur structure normale. Comme les prions subissent une profonde transition structurale durant leur propagation, il semble plutôt logique de voir la participation de chaperonnes moléculaires lors de ce phénomène. Ceci est vrai dans la levure, où des criblages génétiques ont montrés

l'existence d'un facteur, Hsp104, qui supprime le phénotype [*PSI*⁺] et qui agit donc en tant qu'antisuppresseur de [*PSI*⁺]. Hsp104p est une chaperonne moléculaire impliquée dans la tolérance aux stress, faisant partie de la famille conservée ClpB/Hsp100 (revu dans Serio, 2000). Il s'agit d'une ATPase homoexamérique qui tient son rôle protecteur du fait qu'elle resolubilise et replie les protéines agrégées par les stress (Glover, 1998). Ceci explique pourquoi il est possible d'obtenir du « curing » de [*PSI*⁺] quand Hsp104p est en excès (Chernoff, 1995). Chernoff et al. ont d'ailleurs montré que des traitements au Gu·HCl induisait l'expression de Hsp104 ce qui suggérait que le mécanisme de « curing » pourrait passer par Hsp104p (Chernoff, 1995). Une délétion génomique de *HSP104* provoque aussi le « curing » de [*PSI*⁺] (Chernoff, 1995), ce qui fait ressortir une sorte de paradoxe où Hsp104p semble être à la fois un co-prion, vu qu'elle est requise pour la propagation de [*PSI*⁺], mais aussi un remède étant donné que sa surproduction donne le « curing » (Figure 17). Même si le mécanisme d'action de Hsp104p n'est pas encore tout à fait compris, Paushkin et al. ont suggéré un mode d'action qui se base sur le principe d'efficacité d'oligomérisation de Sup35p (Paushkin, 1996). Dans ce modèle, un niveau basal de Hsp104p permet de désagréger partiellement les polymères de Sup35p leur permettant d'exister sous la forme de petits oligomères ou « seeds », ce qui devrait augmenter le taux de conversion de Sup35p, mais aussi le taux de transmission dans les cellules filles suivant la méiose ou la mitose. Quand il y a surproduction de Hsp104p, celle-ci dissout de façon trop efficace les agrégats empêchant ainsi la conversion de Sup35p, alors que quand il y a délétion de *HSP104*, les gros agrégats ont tendance à ségréger dans une seule des deux progénitures lors de la mitose, ce qui rend l'autre cellule à nouveau saine.

A. Hsp104 involved in filament formation:



B. Hsp104 involved in segregation of filaments:



Wickner et al., Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 64, p.844-861

FIGURE 17. Implication de Hsp104p dans la propagation de [PSI⁺].

Hsp104p agit comme co-prion et pourrait être directement impliqué dans la réaction de conversion de Sup35p (A). Il pourrait aussi être impliqué dans la propagation en assurant une ségrégation des particules, dans toutes les cellules, en détruisant les gros agrégats (première partie de B). Ceci semble confirmé par les cellules *hsp104* Δ qui ne réussissent pas à propager [PSI⁺].

À l'heure actuelle, plusieurs nouveaux criblages génétiques ont permis d'identifier d'autres chaperonnes cytoplasmiques, qui quand elles sont surproduites, sont capables de supprimer [*PSI*⁺]. Parmi celles-ci on retrouve des HSP70 tel que Ssa1p (Chernoff, 1995), Ssb1p (Chacinska, 2001), mais aussi des HSP40 comme Ydj1p (Kryndushkin, 2002).

Le projet.

Notre laboratoire a démontré dans le passé que *cnx1*⁺, le gène codant pour l'homologue de la calnexine chez *S. pombe*, était essentiel à la viabilité (Jannatipour, 1995; Parlati, 1995). Lors d'études génétiques sur des mutants de la calnexine, nous avons été en mesure d'isoler des souches viables qui ne contiennent plus *cnx1*⁺ ni dans le génome ni sur plasmide. Au départ, l'intérêt principal était de comprendre comment des cellules pouvaient vivre en l'absence d'une chaperonne moléculaire essentielle. Pour cette raison nous avons envisagé une approche génomique/protéomique qui nous aurait permis d'isoler un/des gène(s), puis une/des protéine(s) de *S. pombe*, capable(s) d'assumer des fonctions cellulaires similaires à celles de la calnexine. Ce genre d'approches nous permettaient aussi de contribuer au catalogage de ce génome récemment séquencé (Wood et al. 2002). Nous avons aussi un intérêt relié à des perspectives biotechnologiques dans la mesure où Cnx1p est impliqué dans le repliement et le control de qualité des protéines dans le RE. En effet, nous étions curieux de tester l'expression hétérologue de protéines modèles dans ces souches et de voir la sécrétion de ces différentes protéines afin d'y vérifier une efficacité accrue dans l'exportation de ces

dernières. Quand nous avons montré que le phénomène de perte *cnx1*⁺ était non-Mendélien et qu'il pouvait s'apparenter au mode de transmission des prions de *S. cerevisiae* [*URE3*] et [*PSI*⁺], notre intérêt est devenu énorme, car nous avons à disposition les premières évidences de l'existence d'un élément non-Mendélien chez la levure *S. pombe*. Comme les prions sont à la base de certaines maladies neurodégénératives très graves, les encéphalopathies spongiformes transmissibles (TSEs), l'étude et la caractérisation de ce phénomène chez *S. pombe* pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de formation et de propagation des prions et ainsi développer des approches thérapeutiques pour traiter ces maladies.

ARTICLE

Fission yeast cells learn to live without the essential chaperone calnexin

Philippe Collin, Aram Elagöz[†], and Luis A. Rokeach^{*}

Département de biochimie, Université de Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

*Corresponding author:

Département de biochimie,
Université de Montréal,
Québec H3C 3J7, Canada
Phone : 1(514)343-6324
Fax : 1(514)343-6069
e-mail : luis.rokeach@umontreal.ca

[†]Present address: Montreal Clinical Research Institute, 110, avenue des Pins Ouest,
Montréal, Québec H2W 1R7, Canada

SUMMARY

Calnexin is a molecular chaperone playing a key role in protein folding and its quality control in the endoplasmic reticulum. We have previously demonstrated that *cnx1*⁺, the gene encoding the calnexin homologue in *Schizosaccharomyces pombe*, is essential for viability of this fission yeast. Here we show that a *cnx1* mutant induces a mechanism allowing the survival of *S. pombe* cells in the absence of the essential chaperone Cnx1p/calnexin. Surprisingly, like prion infectivity this survival pathway to calnexin essentiality can be transmitted by protein transfection into a wild type strain. In addition, this unprecedented mechanism presents several features resembling the *Saccharomyces cerevisiae* prion elements [*URE3*⁺] and [*PSI*⁺], such as dominance over the wild type allele, curability by the anti-prion agent guanidine-HCl and reappearance after curing, as well as dependence on Hsp104. We propose a model in which this calnexin-less survival mechanism is mediated and perpetuated via a prion-like element.

INTRODUCTION

Proper folding of proteins and its quality control are basic and essential cellular processes. A battery of molecular chaperones and foldases assist the *in vivo* folding of proteins, bringing both the efficiency and the yield of this cellular process to levels compatible with life (reviewed in ¹⁻⁴). Inherited alterations in protein folding and/or assembly in the endoplasmic reticulum (ER) constitute the molecular basis for several genetic diseases such as cystic fibrosis, juvenile emphysema, familial hypercholesterolemia, and certain coagulation disorders ⁵. Incorrect folding can be infectious, as is the case of prion-mediated diseases such as sheep scrapie, bovine spongiform encephalopathy (BSE; mad cow disease), and Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) in humans (reviewed in ⁶). Prion propagation is the result of the structural conversion of a native cellular protein (PrP^C) that is mainly α -helical into its prionic conformer (PrP^{Sc}), which is rich in β structure (reviewed in ⁶). Therefore, prions impose their structure on their native conformers thereby mediating a protein-only inheritance mechanism, without a change in the nucleic-acid encoded genetic information. Following structural conversion, the soluble, monomeric PrP^{Sc} conformer polymerises into insoluble amyloid fibres, in which the β structure is stabilised by intermolecular interactions ⁶.

[*URE3*⁺] and [*PSI*⁺] are prion elements found in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and represent exquisite examples of adaptability to alternate growth conditions ⁷⁻¹⁰. [*URE3*⁺] is the prion form of Ure2p, which normally blocks the action of the positive transcription factor Gln3p involved in activation of *DAL5*, a transporter of ureidosuccinate (USA) and allantoin. *S. cerevisiae* cells grown on rich nitrogen sources repress the uptake of both

USA and allantoate. Conversion into $[URE3^+]$ depletes the cell of functional Ure2p, allowing the uptake of USA and allantoate even in the presence of rich nitrogen sources^{8,11}. $[PSI^+]$ is the prion conformer of Sup35p, a factor involved in termination of translation. Conversion into $[PSI^+]$ depletes the cell of active Sup35p, resulting in the suppression of numerous nonsense mutations^{7,9,10,12,13}. $[URE3^+]$, $[PSI^+]$, and other prions can be specifically cured by culturing the cells in the presence of the non-mutagenic compound guanidine-HCl (Gu-HCl), at concentrations much below those required for protein denaturation¹⁴.

Prion conversion and propagation are believed to be assisted by cellular factors, most likely molecular chaperones. For instance, a defined cellular concentration of the *S. cerevisiae* Hsp104p molecular chaperone is required for the propagation of $[PSI^+]$, as both the deletion and overexpression of *HSP104* lead to the curing of this prion¹⁵. Furthermore, overexpression of the Hsp70 chaperone Ssa1p prevents the conversion of insoluble $[PSI^+]$ into soluble Sup35p, thereby antagonizing the curing effect of high levels of Hsp104p¹⁶.

Calnexin is a molecular chaperone of the endoplasmic reticulum (ER) playing a key role in the folding and quality control of numerous secreted and membrane-bound proteins^{17,18}. To explore the functions exerted by calnexin *in vivo*, we have established a genetic system in the fission yeast *S. pombe*. We, and others, have demonstrated that the gene encoding calnexin (*cnx1*⁺) in *S. pombe* is essential for cell viability^{19,20}. Calnexin molecules of all species, except that of *S. cerevisiae*, contain a highly conserved central domain that has been described as being involved in Ca^{2+} binding, and as being required for interaction of this chaperone with glycoprotein substrates via their oligosaccharides²¹.

In a recent study we determined that, in spite of its conservation and encoded functions, the central domain of Cnx1p is dispensable for cell viability, and that the minimal sequences required for viability could be reduced to the last 123 a.a. at the *C*-terminus²².

In this paper, we describe the unprecedented phenomenon by which cells learn to live without the essential chaperone calnexin (Cnx1p). We present evidence strongly indicating that this phenomenon is mediated via a prion-like mechanism.

RESULTS

***S. pombe* cells are viable in the absence of the essential chaperone Cnx1p.**

To explore the functions encoded by calnexin, *cnx1* deletion mutants were assessed using a plasmid segregation assay. Briefly, the experiment consisted in evaluating the functionality of mutants by determining the frequency at which a *S. pombe* strain, disrupted for genomic *cnx1*⁺, retained the episomal copies of mutant *cnx1* (*LEU2* marker) as compared to *cnx1*⁺ on an *ura4* vector. After six days of liquid culture without selective pressure, cells were scored, on selective plates, for the presence of either the WT or mutant *cnx1* plasmids.

As shown on Table I, while WT (#2), *mini_cnx1* (#11) and *luminal_cnx1* (#3) never gave rise to plasmid-free cells, the mutant *deleted_cnx1* (#4) by itself or in the presence of either WT or other *cnx1* mutants consistently gave rise to a population of Leu⁻/Ura⁻ cells. We deduced that the simplest explanations for the appearance of viable Leu⁻/Ura⁻ cells were: *i*) deletion of the marker *LEU2* and integration of the *deleted_cnx1* (#4) sequences into the genome; or *ii*) nonsense mutations in the vector's *LEU2* selection marker and maintenance of the episomal constructs because of the essentiality of *cnx1*⁺. In this regard, however, the frequency of appearance of Leu⁻/Ura⁻ cells (87 %) was several orders of magnitude higher than the expected rates for illegitimate genomic integration or for spontaneous mutations, which in both cases is estimated to be of about 10⁻⁶ ^{23,24}. Because Cnx1p is essential for *S. pombe* viability, it seemed highly unlikely at that time that these Leu⁻/Ura⁻ cells had lost the *cnx1* genes along with the markers/plasmids. Nevertheless, we considered it of importance to ascertain that *cnx1* sequences were

a

b

Constructs	Plasmid-free cells
WT (#2) + WT (#2)	0
<i>lumenal_cnx1</i> (#3) + WT (#2)	0
<i>deleted_cnx1</i> (#4) + WT (#2)	87 ^b
<i>mini_cnx1</i> (#11) + WT (#2)	0
WT (#2) + Vector (pREP42)	0 ^c
<i>lumenal_cnx1</i> (#3) + vector	0
<i>deleted_cnx1</i> (#4) + vector	73
<i>mini_cnx1</i> (#11) + vector	0
WT (#2)	0 ^c
<i>lumenal_cnx1</i> (#3)	0 ^b
<i>deleted_cnx1</i> (#4)	46 ^b
<i>mini_cnx1</i> (#11)	0 ^b
<i>cnx1</i> ^{-/-}	72 ^c ± 1.4
<i>lumenal_deleted_cnx1</i> (#23)	0 ^c
<i>N-terminal</i> (#10) + <i>mini_cnx1</i> (#11)	0 ^c

Table I. Results of plasmid loss assay.

Plasmid segregation assays were carried out in non-selective medium as described in *Methods*. ^a For each row, the first construct mentioned is on the pREP41(*LEU2*) vector and the second construct is on pREP42 (*ura4*). ^b Average of at least two independent experiments. ^c Average of at least three experiments.

present in these marker-less cells. To this effect, we performed PCR, Southern, Northern, and Western analyses as summarised in Figure 1. In the PCR experiments we used different combinations of primers in order to differentiate the amplification of genomic from plasmid DNA. The primer pair 3/4 was specific for the *nmt1* promoter and terminator sequences that are respectively found upstream and downstream of the multicloning sites of both, the pREP41 and pREP42 vectors (see Fig. 1B). Therefore, PCR reactions using this pair of primers allowed the amplification of any sequence cloned within the multicloning site of these vectors, in our case the *cnx1*⁺ or any of the *cnx1* mutants, as well as the *nmt1* genomic sequences. As shown in Figure 1A (lane 1) for one representative of the Leu⁻/Ura⁻ clones analysed, PCR using the pair of primers 3/4 did not produce any amplification band, except for the one corresponding the intrinsic *nmt1* genomic sequences (approximately 1.2 kb). In contrast, the strains #4 (*deleted_cnx1*; Fig. 1A, lane 3), SP556 harbouring the pREP41 empty vector (Fig. 1A, lane 2), or the purified plasmid #2 DNA (WT; Fig. 1A, lane 4), produced the expected PCR amplifications. Thus, according to these PCR results, the Leu⁻/Ura⁻ clones did not contain *cnx1* or other DNA sequences under the control of the *nmt1* promoter, either as plasmid-born or integrated in the *S. pombe* genome. The absence of *cnx1* under the control of the *nmt1* promoter was confirmed by PCR-amplification using the primers 3/2 that hybridises respectively to the *nmt1* promoter and the 3' untranslated region of *cnx1*, which are present in the pREP41-*cnx1* constructs used in this study (see Fig. 1 A and B). We next wished to investigate whether the Leu⁻/Ura⁻ clones were viable because of the possible random integration of *cnx1* sequences into the genome and their expression under the control of a spurious promoter. No *cnx1* transcript could be detected by

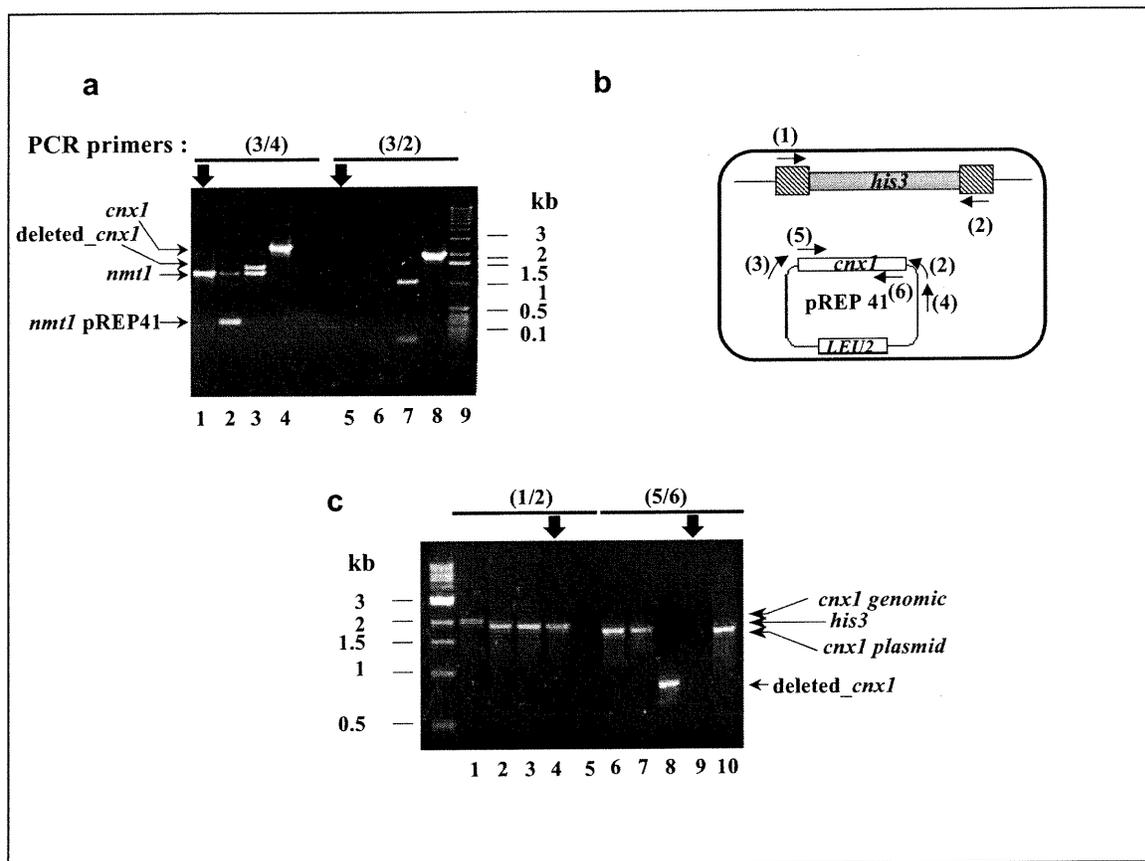


Figure 1. *Leu⁻/Ura⁻* clones are viable *cnx1⁻* cells. PCR, Southern blot, Northern blot and Western blot analyses demonstrate the existence of *cnx1⁻* cells. **a)** Total DNA from a representative *Leu⁻/Ura⁻* clone (lanes 1 and 5), SP556[pREP41] (lanes 2 and 6), *delet_{ed}_cnx1* #4 (lanes 3 and 7), purified plasmid *cnx1⁺* #2 DNA (lanes 4 and 8) were subjected to PCR analysis with two sets of primers. The primer set 3/4 amplifies the *nmt1* coding sequences in the genome and sequences inserted in the multicloning sites of the pREP41 or pREP42. The primer pair 3/2 specifically detects episomal constructs with *cnx1⁺* or *cnx1* mutants. Positions of certain DNA size markers in kb (lane 9), are indicated on the right. **b)** Schematic representation of the *cnx1::his3*[pREP41*cnx1*] haploid strains with the annealing locations for the primers used. **c)** PCR analysis amplifications of *cnx1* and *his3* sequences. Total DNA from a representative *Leu⁻/Ura⁻* clone (lanes 4 and 9), SP556[pREP41] (lanes 1 and 6) *cnx1⁺* #2 (lanes 2 and 7), *delet_{ed}_cnx1* #4 (lanes 3 and 8), or purified empty pREP41 vector DNA (lanes 5 and 10), were subjected to PCR analysis with two sets of primers. The primer set 1/2 amplifies the *cnx1* coding sequences in the genome of WT cells, or the *his3* marker in the *cnx1::his3* strains. The primer pair 5/6 specifically detects genomic or episomal *cnx1* sequences. Positions of DNA size markers are indicated on the left.

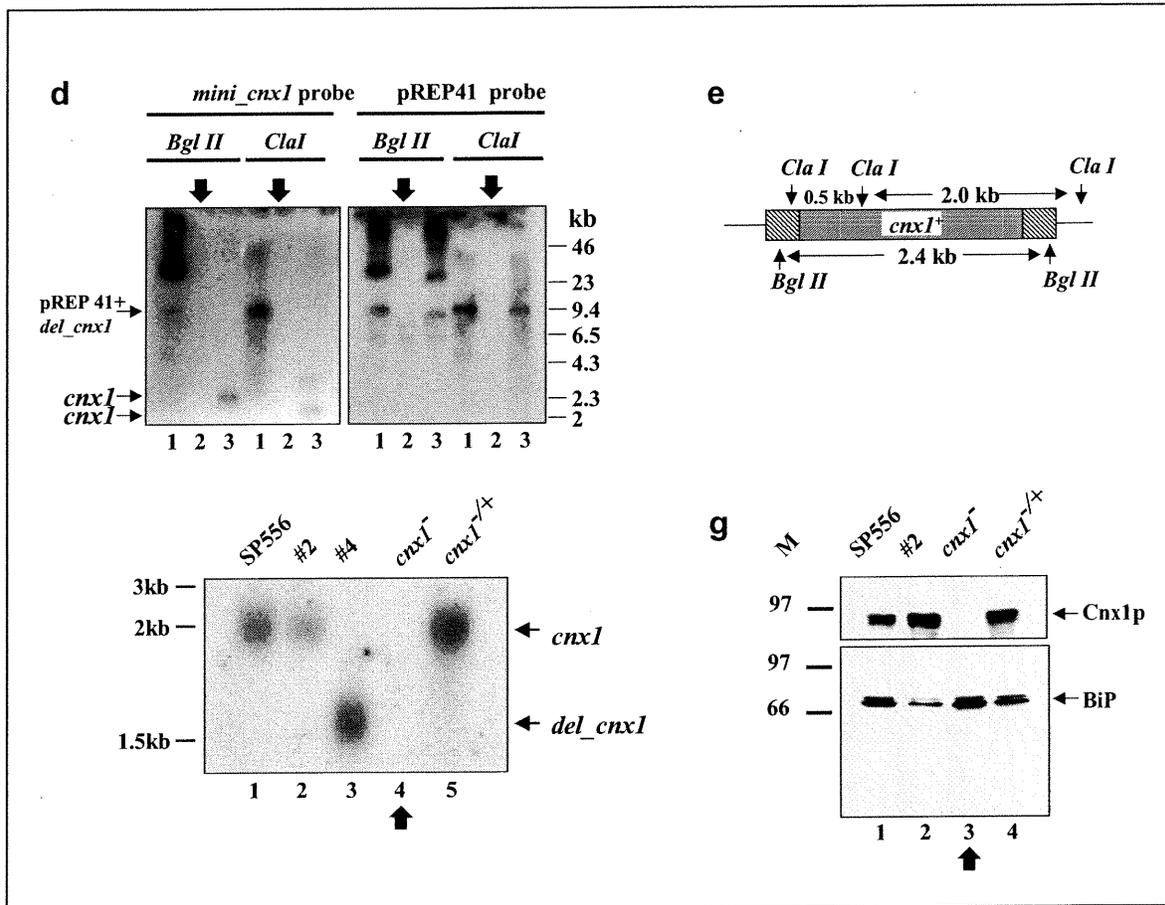


Figure 1. *Leu⁻/Ura⁻* clones are viable *cnx1⁻* cells. **d)** Southern blot analysis showing the absence of genomic integration of *cnx1* coding sequences. DNA from *deleted_cnx1* (#4) (lanes 1), a representative *Leu⁻/Ura⁻* clone (lanes 2), or the control for genomic *cnx1⁺* strain SP556 [pREP41] (lanes 3) was digested with either *Bgl*II or *Cla*I. After transfer, the membranes were hybridised with either the *mini_cnx1* or the pREP41 probes. Positions of DNA size markers are indicated on the right. **f)** Northern blot analysis probing *cnx1*. Total RNA from strains SP556 *cnx1⁺* (lane 1), *cnx1⁺* #2 (lane 2), *deleted_cnx1* #4 (lane 3), *cnx1⁻* (lane 4) and *cnx1^{-/+}* (lane 5) were hybridised with a ³²P-labelled *cnx1* probe. **g)** Western blot analysis using rabbit anti-Cnx1p or anti-BiP polyclonal antibodies, as indicated. Log phase SP556, #2, *cnx1⁻*, and *cnx1^{-/+}* cells were used and total protein extracts were prepared as described in *Methods*, and 10 μg of material was loaded and fractionated by SDS-PAGE. Perpendicular, thick black arrows in panels A, C, D, F, and G indicate the lanes corresponding to analyses of the *Leu⁻/Ura⁻* (*cnx1⁻*) strain.

Northern blot analysis of the $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clones (see Fig. 1F, lane 4). Likewise, while BiP was readily observed with anti-BiP antibodies, no Cnx1p was detectable in protein extracts from $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clones by immunoblot analysis using anti-Cnx1p polyclonal antibodies (see Fig. 1G, lane 3).

As it remained possible that the levels of *cnx1* mRNA and of Cnx1p were below detection in our assays, we further scrutinised the $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clones for the presence of *cnx1* sequences by using PCR and Southern blot analyses. To this aim, we carried out PCR analysis with the pair of primers 5/6 that was designed to amplify the Cnx1p coding region (see Fig. 1B). As shown in Figure 1C, this pair amplified the corresponding bands in DNA extracted from the control strains (lanes 6-8 and 10), but no amplification band could be detected with the $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ strain (lane 9). As a positive control for this experiment, PCR was carried out with the pair of primers 1/2 that amplifies the *his3* marker disrupting the *cnx1* gene in the strains #2, #4 and the $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clone (Fig. 1C, lanes 2, 3 and 4), or *cnx1* coding sequences in the strain SP556 (Fig. 1C, lane 1). Finally, Southern blot analysis revealed that, as opposed to the control strains (Fig. 1D lanes 1 and 3), no band corresponding to *cnx1* sequences was detectable in the $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ clones (Fig. 1D lanes 2).

Therefore, in conclusion, the *S. pombe* $\text{Leu}^-/\text{Ura}^-$ cells described above are viable in the absence of the essential chaperone Cnx1p/calnexin. One of these clones is hereafter designated as the *cnx1*⁻ strain (SP7188).

The Cnx1⁻ phenotype is dominant over the *cnx1*⁺ allele.

As described in Table I (rows 3, 7, and 11), the appearance of *S. pombe* *cnx1*⁻ cells was

only observed with mutant #4 (*deleted_cnx1*). Interestingly, this phenomenon took place even in the presence of *cnx1*⁺, as it was possible to lose the WT construct, but only when construct #4 was present in the cell (Table I, row 3). Otherwise, the WT plasmid (#2) was never lost (see Table I, rows 1, 5, and 9), implying that the effect of mutant #4 *deleted_cnx1* was dominant over the WT *cnx1*⁺ allele. In order to verify the dominance of the *cnx1*⁻ phenomenon, we transformed the *cnx1*⁻ strain with the pREP41-*cnx1*⁺ episomal plasmid (#2), and repeated the plasmid segregation assay. Results from these experiments showed that *cnx1*⁺ alone was now lost, giving rise to a population of *cnx1*⁻ cells at a frequency of about 72% (Table I, row 13), thereby confirming that the Cnx1⁻ phenotype is dominant over the *cnx1*⁺ allele.

***cnx1*⁻ cells display reduced tolerance to environmental stress.**

Since Cnx1p was shown to be essential for *S. pombe* viability, it was of interest to examine whether the lack of the Cnx1p chaperone affected the ability of *cnx1*⁻ cells to cope with various environmental stress conditions. As depicted in Figure 2, when compared to the *cnx1*⁺ strain (#2) the growth rates of *cnx1*⁻ cells was slightly reduced at 30°C (Fig. 2A and C) and considerably slower 37°C (Fig. 2B and C), thus reflecting a reduction in the cell's capacity to withstand thermal stress. Similarly, *cnx1*⁻ cells exhibited reduced chemotolerance to ethanol at 30°C and complete growth inhibition at 37°C (Fig. 3D). To further the phenotypic characterization of *cnx1*⁻ cells, we tested the effect of stress conditions such as CaCl₂, DTT known to affect protein folding in the ER²². In both cases, the growth of *cnx1*⁻ cells was significantly inhibited at 37°C (Fig. 3C), reflecting the inability of these cells to tolerate the combination of thermal and chemical

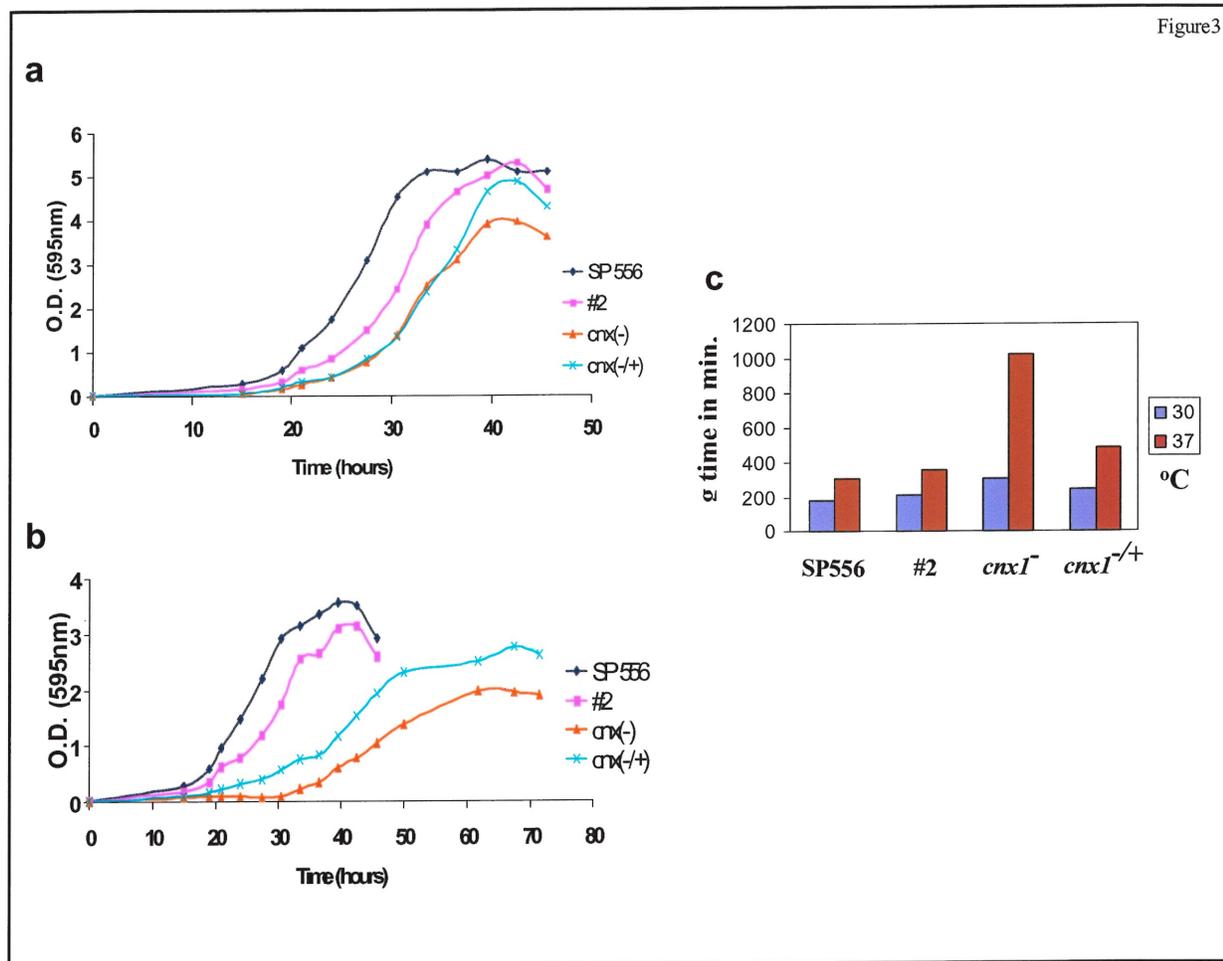


Figure 2. *cnx1*⁻ cells display temperature sensitive growth rate.

Cells were cultured to saturation and then diluted into 10 ml of fresh EMM+Ade+Ura medium to OD₅₉₅ of 0.02. **a)** Growth curves of SP556, wild type (#2), *cnx1*⁻ and *cnx1*^{-/+} cells at 30°C for 45 hours. **b)** Growth curves of the same cells grown at 37°C for 72 hours. **c)** Histograms of calculated growth rates for each strain, at 30°C and 37°C, as indicated.

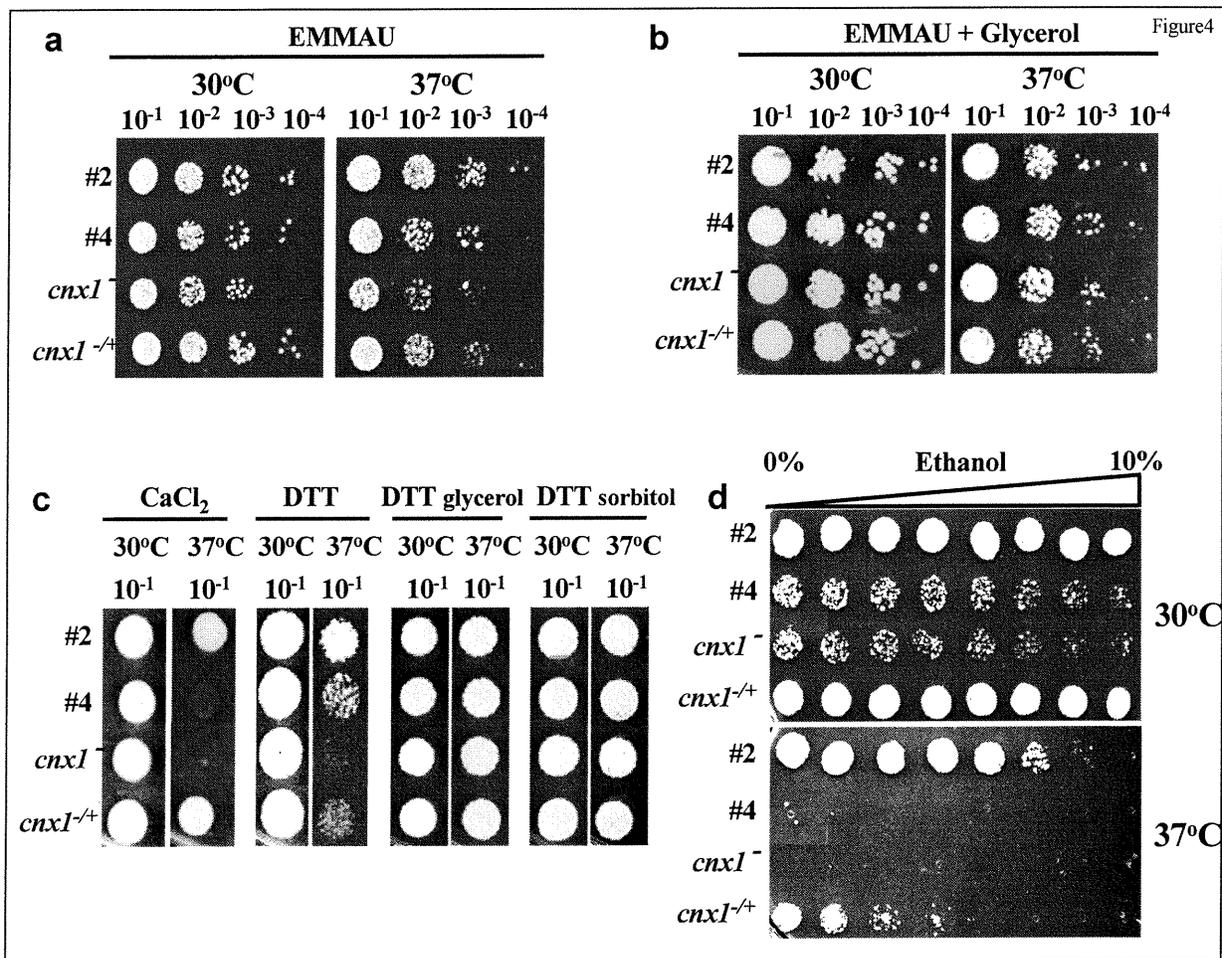


Figure 3. Effects of different stress on the growth of *cnx1*⁻ cells.

Exponentially growing *S. pombe* cells in liquid EMM+Ade+Ura (containing 2% glucose) were spotted in ten-fold serial dilutions on solid medium with or without additives, and incubated at 30°C or 37°C. **A)** EMM+Ade+Ura (2% glucose). **B)** EMM+Ade+Ura (2% glucose + 0.4 M glycerol). **C)** Plates were supplemented with either 10 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 1 mM DTT + 0.4 M glycerol, 1 mM DTT + 0.4 sorbitol, as indicated. **D)** For ethanol tolerance, cells were spotted at equal densities (1x10⁶ cells ml⁻¹) on plates containing an ethanol gradient from 0 to 10% in EMM+Ade+Ura media supplemented with 2% glucose. The plates were incubated for 90 hours at 30°C and 37°C. Strains used in these experiments are indicated.

stress.

Tolerance to temperature alone (Fig. 3A and B) and in concert with DTT (Fig. 3C) was restored by the addition to the culture medium of the chemical chaperones glycerol or sorbitol^{22,25}. Interestingly, the presence of episomal *cnx1*⁺, in the strain *cnx1*^{-/+} reversed only partially the ethanol- and DTT-related stress phenotypes manifested by the *cnx1*⁻ cells. This point will be further discussed below.

***cnx1*⁻ cells exhibit a temperature-dependent morphological defect.**

Due to the lack of Cnx1p, it could be expected that *cnx1*⁻ cells would exhibit altered ER morphology. However, confocal-microscopy analysis with anti-BiP antibodies to stain the ER revealed no distinguishable changes in *cnx1*⁻ cells as compared to *cnx1*⁺ cells (Fig. 5D).

Since Cnx1p is involved in cell-wall biosynthesis assembly²², the next step was to investigate the possibility that *cnx1*⁻ cells presented cell wall defects. The building of the yeast's cell wall requires the biosynthesis, the transport, and the assembly of glycoproteins and β -glucans. The antibiotic hygromycin B preferentially affects the growth of yeasts cells mutated in genes involved in the early steps of glycoprotein biosynthesis, and so certain cell-wall mutants are sensitive to this antibiotic^{22,26}. As shown in Figure 4A, the growth of *cnx1*⁻ cells at 37°C was more sensitive to this antibiotic than WT cells (#2). Analogously, the fluorescent dye Calcofluor White, which inhibits the assembly of cell-wall components, inhibited the growth of *cnx1*⁻ cells at 37°C (Fig. 4C). As it was the case for the stress tests described above, the addition of glycerol to the culture medium significantly suppressed the sensitivity of *cnx1*⁻ cells to these cell-

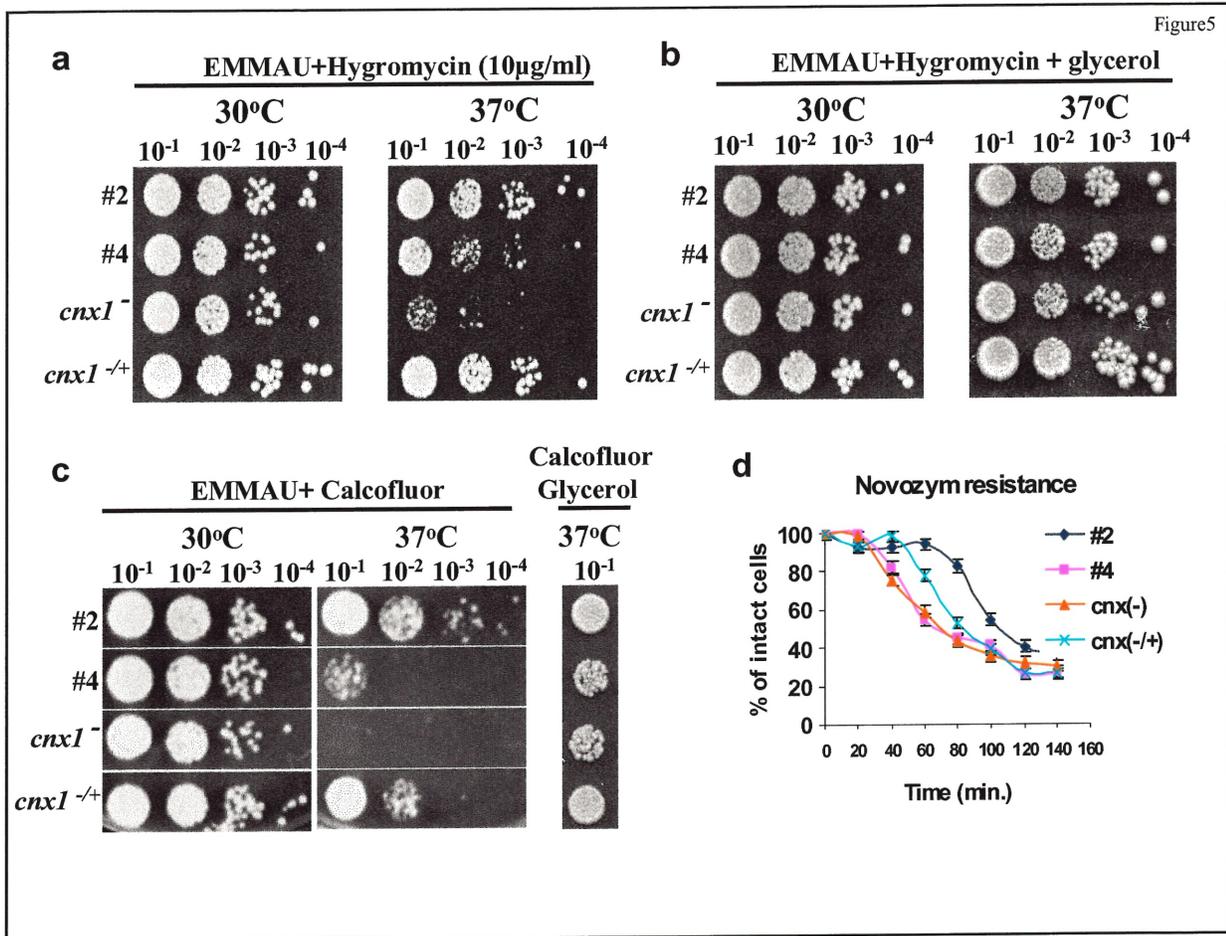


Figure 4. *cnx1*⁻ cells display a thermosensitive cell-wall defect. Sensitivity to the cell-wall biosynthesis inhibitors hygromycin B (**a** and **b**) and Calcofluor White (**c**), was tested by spotting serial dilutions of exponentially growing cells (as described in Fig. 3) on solid MM+Ade+Ura (+2% glucose) medium, or the same medium supplemented as indicated. Glycerol at 0.4 M was added as denoted. Plates were then incubated at 30°C or at 37°C, as indicated. **d**) Resistance to the complex of cell-wall lysing enzymes NovoZym234 was tested on exponentially growing cells as described in Methods.

wall inhibitors (see Fig. 4B and C). Remarkably, while the presence of episomal *cnxI*⁺, in the strain *cnxI*^{-/+}, suppressed the effect of hygromycin B, the Calcofluor-mediated growth inhibition was only partially reversed by the introduction of the *cnxI*⁺ plasmid. Thus, it appears as though reintroduction of episomal copies of *cnxI*⁺ into *cnxI*⁻ cells did not fully complement the defects in the late stages of cell-wall biosynthesis that we observed in Cnx1p-less cells. We hypothesised that if this were the case, the strain *cnxI*^{-/+} should also exhibit weakened cell-wall resistance in comparison to *cnxI*⁺ cells (#2). To further investigate this point, we performed an assay monitoring the resistance to lytic enzymes (Fig. 4D). As expected, while *cnxI*⁻ cells were considerably more sensitive than WT to NovoZym234, the resistance of the *cnxI*^{-/+} strain to this complex of lytic enzymes was intermediate between those of the Cnx1p-less cells and the *cnxI*⁺ cells.

To continue our cell-wall study, we next performed morphological observations using Nomarski-interference microscopy. Like certain previously characterised *cnxI* mutants²², the *cnxI*⁻ cells exhibited at 30°C a rounder shape than WT (Fig. 5A), and this altered morphology was more evident when these cells were grown at 37°C. This phenotype is consistent with defects in the cell wall, and can be usually corrected by culturing the cells in hyperosmotic medium²², and the aberrant morphology was corrected by the addition of sorbitol or glycerol (Fig. 5B), or suppressed by the presence of *cnxI*⁺ in the *cnxI*^{-/+} strain (Fig. 5C). The fluorescent dye Calcofluor White stains a cell-wall component that accumulates in the septa of dividing *S. pombe* cells. Fluorescent staining of *cnxI*⁻ cells showed accumulation of dye in large vesicles. This could suggest that the cell wall and morphology defects exhibited by *cnxI*⁻ cells are due to the accumulation of the Calcofluor-stainable material in transport-impaired vesicles, that in turn results in the

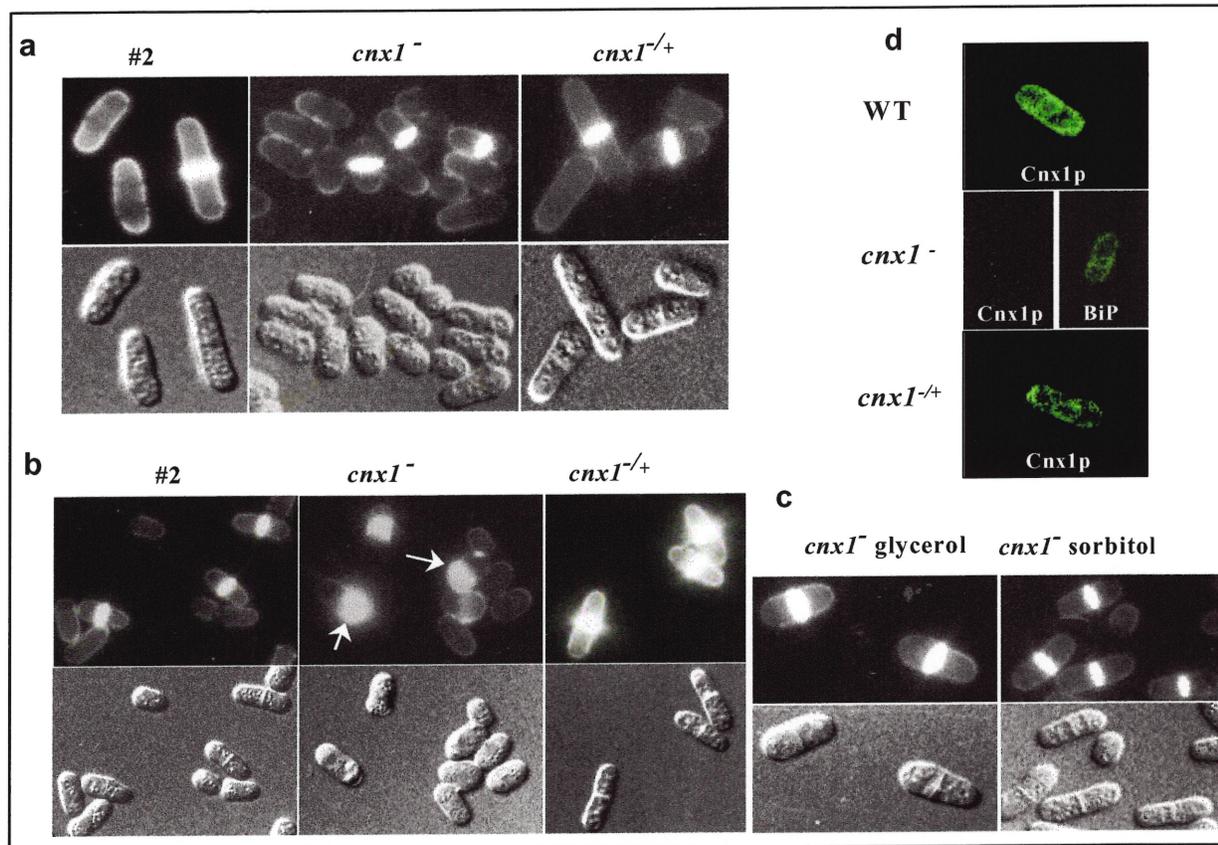


Figure 5. *cnx1*⁻ cells display thermosensitive altered morphology. Panels (a-c) *S. pombe* cells exponentially grown at 30°C were incubated for 20 hours in EMM+Ade+Ura (2% glucose) at 30°C (a), at 37°C (b), or at 37°C in the same medium was also supplemented with glycerol (0.4M) or sorbitol (0.4M) (c). Cells were then stained with the fluorescent dye Calcofluor White (upper part of panels a and b). Nomarsky interference images show the same fields as those stained with Calcofluor (lower part of panels a and b). Arrows indicate intracellular accumulation of the fluorescent dye. d) Confocal indirect immunofluorescence analysis on *cnx1*⁺ (WT #2), *cnx1*⁻, and *cnx1*^{-/+} cells was carried out with anti-Cnx1p rabbit antibodies (as described in Methods). For the *cnx1*⁻ strain, anti-BiP antibodies were used for the staining of the *cnx1*⁻ strain.

absence or lower levels of cell wall components at the cell surface.

Because calnexin is a chaperone involved in protein folding in the ER, we thought it important to assess whether glycoprotein secretion was affected in the *cnxI*⁻ cells. Therefore we evaluated the secretion of *A. aculeatus* cellulase I by measuring its activity in the medium of cultured *cnxI*⁻ cells, as compared to WT (#2). The Cnx1p-less cells secreted approximately two-fold more cellulase I than the WT #2 (data not shown). This alteration in secretion could be due to differences in the chaperone balance between assistance in folding and protein retention resulting from the absence of Cnx1p in the *cnxI*⁻ cells. Alternatively, increased secretion by the *cnxI*⁻ cells could be due to changes in the cell-wall structure that would result in different protein-sieving characteristics²⁷. As is the case for most of the phenotypes described above, the introduction of episomal *cnxI*⁺ (*cnxI*^{-/+} strain) reversed only in part the increased secretion of cellulase I (not shown).

The Cnx1⁻ phenotype can be transmitted by protein transfection.

We envisaged that the absence of Cnx1p would be compensated, at least in part, by an increase in the expression of other genes implicated in protein folding in the ER. Accordingly, we performed Northern blot analyses to probe the levels of expression of the genes encoding the chaperone BiP (binding protein; accession X64416), the glucosyl transferase UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase (accession U38417), and the foldases Pdi1 (protein disulfide isomerase; accession Z68136), Pdi2 (a membrane-bound protein disulfide isomerase; accession Z98597), and Ppi (peptidyl-prolyl isomerase; accession 3810849). Interestingly, however, the expression of these genes in the *cnxI*⁻

and *deleted_cnx1* (#4) at 30°C, was significantly lower than in the *cnx1*⁺ strain #2 (not shown).

Therefore, these mRNA analyses strongly indicated that increased expression of ER-folding related genes did not compensate the absence of Cnx1p in the *cnx1*⁻ strain. This then begged the question of what other mechanism allows the loss of episomal *cnx1*⁺ and the survival of *S. pombe* cells in the absence of Cnx1p. From the various phenotypes described thus far for the *cnx1*⁻ strain we can highlight the following key points: *i*) Cnx1p is an essential ER chaperone of *S. pombe* that becomes dispensable when the mutant *deleted_cnx1* #4 is present in the cell; *ii*) due to the high frequency at which it occurs the *cnx1*⁻ phenomenon is unlikely to be the result of mutations or rearrangements in the *S. pombe* genome; *iii*) the phenomenon leading to the loss of episomal copies of *cnx1*⁺ is dominant as reintroduction of the *cnx1*⁺ allele does not suppress this phenotype; *iv*) most of the *cnx1*⁻-associated phenotypes are dominant over the *cnx1*⁺ allele.

In the yeast *S. cerevisiae* there are two well-characterised examples of nucleic acid-independent dominance over the WT allele. These are the prion-like particles [*URE3*⁺] and [*PSI*⁺] (see Introduction and refs. ^{8,9,13}). A distinctive feature of prions is the non-Mendelian, cytoplasmic inheritance of the phenotype, which results from a change in the structure of the protein and not because of a change in the nucleic-acid encoded genetic information. The elements [*URE3*⁺] and [*PSI*⁺] are compelling examples of protein-only inheritance. A demonstration for the non-genomic, nucleic acid-independent feature of this type of prion-like mediated inheritance is the transmission of the phenotype, by cytoduction, in which mating between yeasts is incomplete, leading to cytoplasm mixing without nuclear fusion. Sparrer et al. ²⁸ have recently shown that the prion [*PSI*⁺] is

infectious as it can be transmitted to a [*psi*⁻] haploid strain by mixing loaded liposomes with spheroplasts.

Because of the dominance of the Cnx1⁻ phenotype over the *cnx1*⁺ allele, we thought it of interest to explore the possibility of nucleic acid-independent inheritance. To test this hypothesis, we performed an experiment that consisted in preparing protein extracts from the *cnx1*⁻ strain, transforming them into the WT strain (#2), and subsequently assessing whether it was possible to obtain *cnx1*⁻ cells in this manner. The protein extracts were centrifuged into soluble and sedimentable fractions, and both were extensively treated with DnaseI, RNaseA and UV-irradiated to degrade contaminating nucleic acid. The absence of DNA was confirmed by PCR analysis using primers designed to amplify the genes encoding BiP, Pdi1 and Ppi1 (data not shown). As a control for the protein transfection experiments, extracts from the WT strain (#2) were also transformed into the WT strain (#2). In order to transfect the protein extracts, we adapted two methods used for DNA transformation into *S. pombe*: the Li⁺/PEG procedure and a spheroplast transformation technique mediated by liposomes (see Methods). Following protein transfection, phenotype changes were monitored by plasmid segregation in non-selective medium, as described above. Soluble and sedimentable protein extracts from the *cnx1*⁻ strain consistently provoked the loss of episomal *cnx1*⁺ after transfection and resulted in the highly efficient appearance of *cnx1*⁻ cells at a frequency of 0.5 % of the unselected cells plated, with either transformation method. In contrast, extracts prepared from the WT strain (#2) did not induce the “Cnx1⁻ phenotype”, i.e. loss of episomal *cnx1*⁺ in the transformed strain (not shown). Because prions were shown to be partially resistant to proteases, we next treated the protein extracts with proteinase K to verify whether or not

transmission of the Cnx1⁻ phenotype was sensitive to proteolytic digestion. This experiment showed that transmission of the phenotype was partially resistant to proteinase K and that the appearance of the *cnxI*⁻ cells was proportional to the amount of protein used in the transfection (see Fig. 6a). These results are consistent with the possible implication of a prion in calnexin-less survival.

Two independent *cnxI*⁻ clones obtained with each method were further studied. The Cnx1⁻ phenotype was tested by retransforming the plasmid pREP41-*cnxI*⁺, and subsequently performing the plasmid segregation assay in liquid non-selective medium. These clones showed comparable frequencies of episomal *cnxI*⁺ loss (~70%) to the *cnxI*^{+/+} strain described earlier. Moreover, PCR and Western blot analyses ascertained, at the molecular level, that clones obtained by protein transformation were indeed *cnxI*⁻ (data not shown). Therefore, the Cnx1⁻ phenotype is transmissible by “infection”, most likely in a nucleic acid-independent, protein-mediated manner, which is consistent with the prion-like characteristics observed for the elements [*PSI*⁺]²⁸.

The Cnx1⁻ phenotype can be cured by the anti-prion agent guanidium hydrochloride.

To further explore the hypothesis of a prion-like mechanism involved in the appearance and survival of *cnxI*⁻ cells, we tested another distinctive feature of these particles, which is curability by culturing the prion-containing cells in the presence of low concentration of guanidium chloride (1-5 mM Gu·HCl; ^{8,13,14}). We assumed that if a prion were involved in the survival of *cnxI*⁻ cells, interference with prion formation by Gu·HCl would result in a reduction of the viability of *cnxI*⁻ cells. Conversely, due to functional

complementation by the *cnxI*⁺ episome, *cnxI*^{-/+} cells should be able to live despite interference of Gu-HCl with the putative prion-like mechanism. As shown in Figure 6b, while the *cnxI*⁺ and *cnxI*^{-/+} strains grew to the same extent on medium containing Gu-HCl, the growth of *cnxI*⁻ cells was dramatically inhibited, thus supporting our hypothesis. Alternatively, it could be argued that the inability of *cnxI*⁻ cells to grow in medium containing Gu-HCl is due to a toxic effect of this compound on this strain that exhibits reduced tolerance to stresses. However, we disfavour this possibility because the various stresses tested had also a considerable inhibitory effect on the growth of the *cnxI*^{-/+} strain, but Gu-HCl did not. Moreover, these various stresses had a net inhibitory effect at 37°C, whereas the growth inhibition of Gu-HCl was evident at 30°C.

To further our study, we wished to assess the effect of another anti-prion agent. Congo red is a dye that has been characterised as interfering with the formation of prion particles²⁹, thus we tested its effect on the *cnxI*⁻ strain. As shown in Figure 6b, albeit not completely inhibited, the growth of *cnxI*⁻ cells was reduced, on medium containing 10 µM Congo red, while *cnxI*^{-/+} cells were able to grow to the same extent as the WT strain #2. Hence, here again episomal *cnxI*⁺ complements the growth sensitivity of *cnxI*⁻ to a drug interfering with prion formation. The differential severity of these two anti-prion agents on *cnxI*⁻ growth may probably stem from their distinct mechanisms of inhibition of prion replication. Congo Red was reported to bind to the late stages of amyloid propagation by binding to β-sheets, thereby stabilizing the prion particle and inhibiting its propagation²⁹. Whereas, Gu-HCl seems to act at an earlier stage¹⁴, possibly by inhibiting the activity of Hsp104³⁰, and thus considerably reducing the number of prion particles able to propagate. These distinctions in mechanisms may translate in differences

in the kinetics of the clearance of prion particles during cell division, throughout generations.

The hallmark of the *cnxI*⁻ strain is the loss of episomal *cnxI*⁺. Therefore, we hypothesised that interfering with the putative prion-like mechanism should diminish the frequency of episomal-*cnxI*⁺ loss in the plasmid segregation assay. As Gu-HCl produced the most severe phenotype on *cnxI*⁻ cells, we examined its effect on *cnxI*⁺-plasmid segregation in different conditions. Accordingly, we analysed the effect of growing *cnxI*⁺ cells on solid medium containing 5 mM Gu-HCl prior to the segregation assay. Indeed, the frequency of episomal-*cnxI*⁺ loss was diminished from around 70% to an average of approximately 35% (Fig. 7c, column III). Moreover, when the plasmid segregation experiment was carried out in liquid medium containing 5 mM Gu-HCl, the rate of *cnxI*⁺-plasmid loss was further reduced to approximately 20% in average (Fig. 7c, column II).

A characteristic of the *S. cerevisiae* prions [*URE3*⁺] and [*PSI*⁺] is that the loss of these elements is reversible, i.e. they reappear after curing. In order to test this point, the cells grown in liquid medium containing 5 mM Gu-HCl (described in Fig. 7b, column II), were washed and grown in medium without Gu-HCl and subjected to two subsequent rounds of plasmid segregation without Gu-HCl. As shown in Figure 7c IV), this treatment brought back the frequency of *cnxI*⁺-plasmid loss to approximately 70%. The rapid reversibility of the Gu-HCl treatment further argues against the possibility that *cnxI*⁻ cells arise as a result of mutations in nucleic acid-encoded information, or that this compound acts by selecting a particular population of Gu-HCl-resistant cells.

It was intriguing, that the frequency of *cnxI*⁺ of episomal could not be further reduced under these conditions. In an attempt to improve the curing we submitted *cnxI*^{-/+}

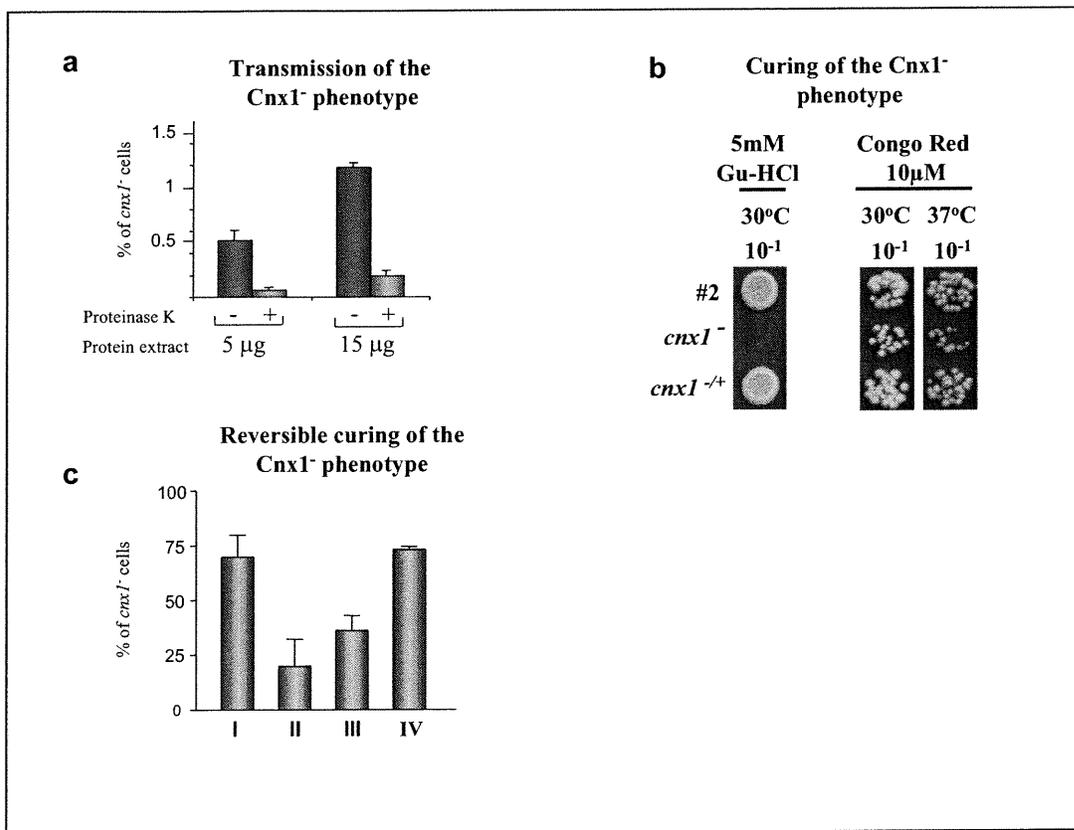


Figure 6. The Cnx1⁻ phenotype is transmitted by protein transfection and cured by the anti-prion agent Gu-HCl.

a) Transmission of the Cnx1⁻ phenotype by protein transfection. Protein extracts from *cnxI⁻* cells were prepared as described in Methods, and were treated or not with proteinase K as indicated. Five and 15 μg of these extracts were transformed with the PEG method. After plasmid segregation assay the appearance of *cnxI⁻* cells was scored. **b)** Inhibition of growth of *cnxI⁻* by, and tolerance of *cnxI^{-/+}* to the anti-prion agents Gu-HCl (5 μM) and Congo red (1 μM) was evaluated on solid medium. **c)** Curing and reversibility of the Cnx1⁻ phenotype. The percentage of *cnxI⁺*-plasmid loss was assessed for the *cnxI^{-/+}* strain by the plasmid segregation assay (column I). *cnxI^{-/+}* cells were grown on solid medium containing 5 mM Gu-HCl, subsequently subjected to the plasmid segregation assay, and the percentage of the *cnxI⁺* plasmid loss was evaluated (column II). The plasmid segregation experiment was carried out in liquid medium containing 5 mM Gu-HCl (column III). To test the reversibility of the curing, the cells grown in liquid medium containing 5 mM Gu-HCl (described in column II), were washed and grown in medium without Gu-HCl and subjected to two subsequent rounds of plasmid segregation without Gu-HCl (column IV). The values shown represent the average of 3 independent experiments.

cells to repeated cycles of enrichment consisting in 5 days of growth in non-selective liquid medium and 2 days selection for the episome, always in the presence of Gu-HCl. After plating, 10 colonies were tested by plasmid segregation assay and 6 of these did not give rise to *cnxI*⁻ cells, demonstrating the ability of Gu-HCl to cure the Cnx1⁻ phenotype. Reversibility of the Gu-HCl curing was confirmed by transforming these cured cells with pREP42-*cnxI*⁺ plasmid, which led to the appearance of *cnxI*⁻ cells after plasmid segregation.

Taken together, these results show that, like the [*URE3*⁺] and [*PSI*⁺] elements, the mechanism leading to appearance of *cnxI*⁻ cells is curable by the non-mutagenic anti-prion agent Gu-HCl. Thus, the mechanism allowing the viability of cells without Cnx1p is both curable by Gu-HCl and reversible, both being distinctive features of prions^{6,8,13,31}.

The mechanism leading to the appearance of *cnxI*⁻ cells requires the cytosolic tail of Cnx1p.

As described above and in Table I, the appearance of *cnxI*⁻ cells takes place only in the presence of mutant #4 (*deleted_cnxI*), which is deleted of the calnexin's highly conserved central region. In contrast, mutant #11 (*mini_cnxI*), which in addition lacks the *N*-terminal domain of Cnx1p, does not elicit the loss of episomal *cnxI*⁺. Therefore, we tested whether it was possible to complement the inability of *mini_Cnx1p* to induce the appearance of *cnxI*⁻ cells by providing in trans *N*-terminal_Cnx1p (mutant #10). As it is possible to see on Table I (row 15), the simultaneous presence of mutants #10 and #11 in the same cell did not result in *cnxI*⁺ loss. Therefore, the induction of the mechanism

leading to *cnxI*⁻ cells requires that the *N*-terminal and *C*-terminal parts of Cnx1p be associated covalently.

Next, we assumed that the initiation of the *cnxI*⁻ mechanism would probably require the induction of gene(s), whose product(s) should complement for the absence of the Cnx1p chaperone. Secondly, we hypothesised that expression of these genes should be elicited via the transduction of a signal from the ER, either directly to the nucleus or via the cytosol. Thirdly, since *cnxI*⁻ cells appear only with *deleted_cnx1* (#4) but neither with *mini_cnx1* (#11) nor with the other mutants, we reasoned that the *deleted_Cnx1p* molecule itself should be implicated in the transduction of a signal inducing the Cnx1⁻ phenotype. Lastly, we assumed that because of its topology, the Cnx1p's cytosolic tail could be the effector domain relaying the signal outside of the ER. To test these hypotheses, we constructed a soluble version of mutant #4 designated *luminal_deleted_cnx1* (#23), in which the Cnx1p's transmembrane domain and cytosolic tail were deleted from *deleted_cnx1* (#4). Consistent with our assumptions, the *luminal_deleted_cnx1* (#23) mutant failed to produce *cnxI*⁻ cells in the plasmid segregation assay (see Table I, row 14). Thus, both the *N*-terminal domain and the cytosolic tail of *deleted_cnx1* (#4) are required to elicit the appearance of *cnxI*⁻ cells.

DISCUSSION

In this paper we report the unprecedented phenomenon by which a gene essential for viability becomes dispensable. Here, we show that *S. pombe* cells adapt to live in the absence of the essential molecular chaperone Cnx1p. Remarkably, this survival adaptation appears to be transmitted by protein transfection, in a manner reminiscent of prion infectivity.

The viability of cells lacking the essential chaperone Cnx1p implies the existence of an inducible pathway replacing the Cnx1p's encoded function(s). Since *cnx1⁻* cells present several phenotypes, this proposed pathway appears to suppress only in part the absence of Cnx1p. Interestingly, upon reintroduction of episomal *cnx1⁺*, the phenotypes displayed by *cnx1⁻* cells were only partially corrected, and *cnx1⁺* remained dispensable for viability, as it could be lost in the plasmid segregation experiments. Taken together, these observations show that this phenomenon is dominant over *cnx1⁺*, as once it is initiated the survival pathway remains turned on, and the other phenotypes expressed by *cnx1⁻* cells are suppressed only in part. The dominance and the permanence of the phenomenon over the WT allele are reminiscent of the yeast prion elements [*URE3⁺*] and [*PSI⁺*]. In addition, the following lines of evidence suggest the implication of a prion-like component in the mechanism allowing the survival of *cnx1⁻* cells: *i*) the phenotype is "infectious", as it can be transmitted by protein transfection; *ii*) the loss of episomal *cnx1⁺* during plasmid segregation is sensitive to the anti-prion agent Gu-HCl; *iii*) the curing by this compound is reversible, as *cnx1⁻* cells arise at the original frequency after two cycles of plasmid segregation in the absence of the drug. Finally, inception of the

cnx1⁻ viability mechanism requires both the *N*-terminal domain of Cnx1p and its cytosolic tail, the latter probably being an effector in relaying a signal that triggers the survival pathway.

A model for the appearance and survival of *cnx1⁻* cells.

Based on the aforementioned observations and assumptions, we propose a model for the appearance and survival of *cnx1⁻* cells. The main features of this model resemble those of the [*URE3⁺*] prion element and the Gln3p transcription factor in *S. cerevisiae*^{8,11}. We envisage that the simplest model (see Figure 7) comprises two key elements: 1) a suppressor gene for Cnx1p essentiality (*scx1*, for suppressor of *cnx1*); and 2) a repressor of *scx1* (*cip1* for Cnx1p-induced prion), whose product has prion-like features and can convert from Cip1p^C to Cip1p^{Sc}. It should be noted that Scx1p is not a full functional homologue of Cnx1p since, as discussed previously, *cnx1⁻* cells display several stress-related and cell-wall phenotypes.

Panel A describes WT Cnx1p exerting its chaperone function in the folding of proteins in the ER, and *scx1* expression is repressed by Cip1p^C. WT Cnx1p might negatively regulate *scx1* expression by interacting with Cip1p^C. For the sake of simplicity, Scx1p is described as being involved in protein folding in the ER, however it may have roles in other processes. Panel B describes the scenario in which deleted_Cnx1p (mutant #4) is present alone or along with WT Cnx1p or other Cnx1p mutant. Due to its particular conformation deleted_Cnx1p induces directly or indirectly, via its cytosolic tail, the structural change of Cip1p^C into Cip1p^{Sc}. This subsequently leads to the formation of prion-like particles. As a result, the functional depletion of the Cip1p^C repressor would

constitutively activate *scx1* expression, and thereby Cnx1p becomes non-essential. In this context, episomal *cnx1*⁺ can be lost when no selective pressure is applied for the plasmid marker. Panel C, finally, the Cip1p^{Sc} prion-like particles are perpetuated by “structural replication” and polymerisation into amyloid fibers, and thus the Cnx1⁻ phenotype becomes dominant and permanently transmitted.

The *scx1* pathway may be a functional back-up to Cnx1p/calnexin that could be reversibly turned-on under certain conditions, such as extreme protein folding stress. Under these conditions *scx1* expression would be likely to occur in a modulated fashion, involving the interplay of at least two elements: WT Cnx1p and Cip1p^C. The structural conversion of Cip1p^C into Cip1p^{Sc} via the deleted_Cnx1p signalling would render the induction of *scx1*, and its associated pathway, permanent and refractive to *cnx1*⁺. Because of the close similarity between the basic cellular processes in yeasts and in higher eukaryotes cells, this pathway alternative to Cnx1p/calnexin might be also present in mammalian cells. Interestingly, Cne1p the calnexin-related molecule in *S. cerevisiae* is not essential for viability. Therefore, it is tempting to speculate that the putative *scx1*-pathway might be present and active in the budding yeast.

Finally, as mentioned earlier, molecular chaperones have been implicated in prion formation and propagation^{15,16}. Interestingly, the implication of chaperones may implicate domains not directly involved in protein folding. For instance, Sondheimer *et al.*³² have recently shown that *Saccharomyces cerevisiae* strains deleted of the G/F domain of the cytoplasmic Hsp40 chaperone Sis1 fail to produce and propagate the [RNQ⁺] prion. In the case presented here, a structural change in an ER chaperone (deleted_Cnx1p) induces the formation of a putative prion, which in turn makes this

chaperone non-essential, probably because of the induction of an alternative-folding pathway. We will use a combination of genetic and biochemical approaches in order to delineate the components of the *sex1*-pathway, and map their circuitry. These studies should be instrumental in furthering our understanding of prion formation and propagation, as well as in unravelling novel genes involved in protein folding and its control.

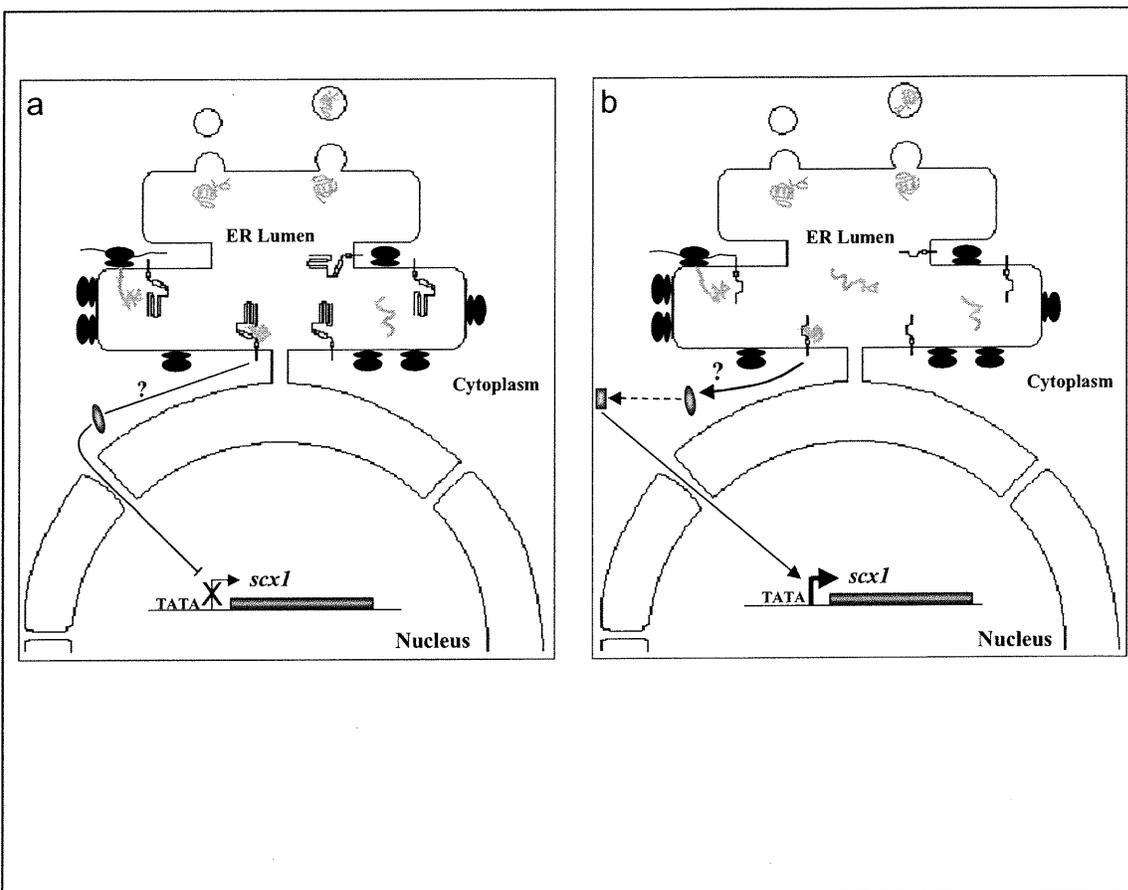


Figure 7. Model for the hypothetical prion-like survival mechanism in *cnx1*⁻ cells.

This model comprises two key elements: 1) a suppressor gene for Cnx1p essentiality (*scx1*, for suppressor of *cnx1*); and 2) a repressor of *scx1* (*cip1* for Cnx1p-induced prion), whose product has prion-like features and can convert from Cip1pC to Cip1pSc. Details of this model are found in the Discussion section.

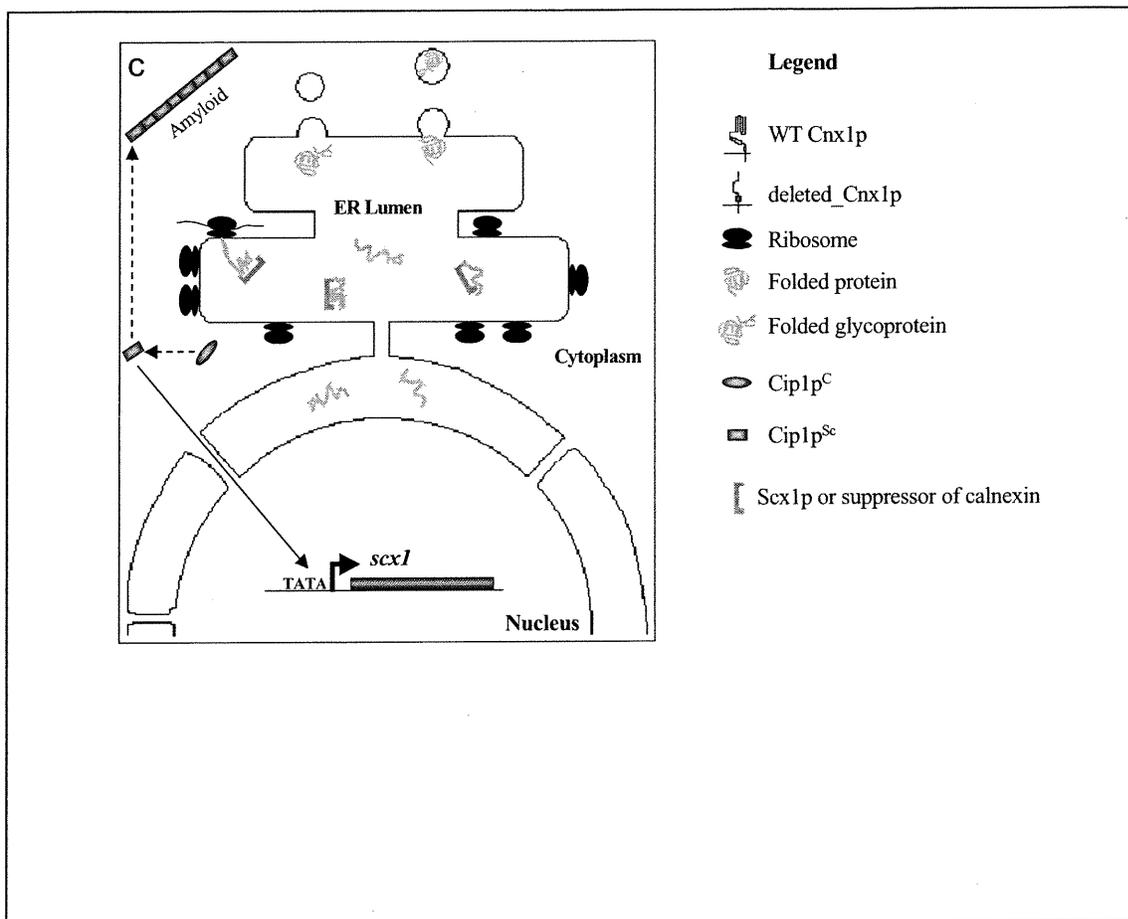


Figure 7. Model for the hypothetical prion-like survival mechanism in *cnx1*⁻ cells.

This model comprises two key elements: 1) a suppressor gene for Cnx1p essentiality (*scx1*, for suppressor of *cnx1*); and 2) a repressor of *scx1* (*cip1* for Cnx1p-induced prion), whose product has prion-like features and can convert from Cip1p^C to Cip1p^{Sc}. Details of this model are found in the Discussion section.

Methods

Strains and media.

The *S. pombe* strain SP6089 (*h⁻his3-D1 ade6-M216 ura4-D81 leu1-32 cnx1::his3* [pSPCA3261]); was used in plasmid segregation experiments, and its construction was described ²². Derivatives of this strain were obtained by plasmid shuffling replacing the resident pSPCA3261 (*cnx1⁺* #2 in vector pREP42 *LEU2* selection marker) with *cnx1* mutants in vector pREP41 (*ura4* selection marker), as previously described ²². The *S. pombe* strain designated *cnx1⁻* was obtained as the result of the loss of plasmid #4 (see Table I and ²²). The strain *cnx1^{+/+}* was obtained by transformation of *cnx1⁻* with *cnx1⁺* (#2) in vector pREP41. *S. pombe* strain SP556 (*h⁺his3-D1 ade6-M216 ura4-D81 leu1-32*) was used as a wild-type control in certain experiments. *S. pombe* strain *cnx1^{+/+} hsp104Δ* (*h⁺his3-D1 ade6-M216 ura4-D81 leu1-32 cnx1::his3 hsp104::neo^R*) was obtained after knocking out the *hsp104* gene (accession number P31539) from *cnx1^{+/+}*. YEAU + G-418 100 μg/ml and EMMAU + G-418 100 μg/ml were used to select integrants.

In genetic crosses, *cnx1⁻* strain was used as a donor of the putative prion, recipient strain SP 248 (*h⁺his3-D1 ade6-M210 ura4-D81 leu1-32*) was used to produce a *cnx1⁻* strain with a compatible mating type (*h⁺*) (**SP**) with wt strain #2. Following mating between #2 (**SP?**) and the *cnx1⁻*, ten asci were isolated and spore dissection was done. The four spores of each asci were then analyzed by plasmid loss to monitor the segregation of the [*cnx1⁻*] trait.

Transformations into *S. pombe* cells were performed by the PEG-lithium acetate

procedure as previously described ³³. Unless otherwise indicated, *S. pombe* strains were grown at 30°C in minimal medium (EMM) supplemented with nutrient requirements ³³.

Plasmids and nucleic acid manipulation.

pREP41 is an *S. pombe* expression multicopy vector bearing the *LEU2* marker and the *arsI* origin of replication. pREP42 differs from pREP41 in that it contains the *ura4* marker instead of *LEU2*. Expression of cloned sequences in these plasmids is under control of thiamine repressible *nmt41* promoter ³⁴. The pPITc1 plasmid that produces constitutively cellulase I from *Aspergillus aculeatus* under the control of the *adh1* promoter and containing the *ura4* marker, was kindly provided by Dr. Thomas Sandal ³⁵. The pSLF172 plasmid, that overproduces a triple HA-tagged Hsp104p, under the control of the *nmt1* promoter, with the *ura4*⁺ marker, was kindly provided by Dr. Susan Forsburg (Salk Institute). PCR products were cloned using the pCR XL TOPO[™] vector according to manufacturer's conditions (Invitrogen) Nucleic acid manipulation and analysis were done as previously described ³⁶.

Polymerase Chain Reaction.

PCR amplifications were carried out using *Taq* polymerase using manufacturer's conditions (Pharmacia Biotech), and 100 ng of *S. pombe* total DNA of the strains in this study. Primers used for the amplification of the *his3* gene integrated in the genome at *cnx1* locus were; (1) 5'-CAACTTACCAGATAGGTCTTTC-3' and (2) 5'-GGCTTTTAACAGAGTCGCTAC-3'; for the amplification of the *nmt1* promoter and the cloning cassette of the expression vectors pREP41 and pREP42; (3) 5'-

CGGCAATGTGCAGCGAAAC-3' and (4) 5'-TATCTCATCTAAACCAC-3' and finally for the amplification of *cnx1* or the *deleted_cnx1* mutant construct; (5) 5'-CCACCCAACACGTGCATATGAAGTACGGAAAG-3' and (6) 5'-CGGGATCCGGCTTTTAACAGAGTCGCTAC-3'. Amplifications with the pair of primers 1/2 and 5/6 were carried out as follows: 94°C for 30 sec, 50°C for 30 sec, 72°C for 2 min 30 sec. Amplifications with the primers 3/4 and 3/2 were carried out as follows: 94°C for 30 sec, 48°C for 30 sec, 72°C for 1 min 50 sec. The *S. pombe hsp104*⁺ (O94641) was found at <http://us.expasy.org/sprot/>, using the Quick BlastP search from *S. cerevisiae HSP104* (P31539). PCR amplification of this gene was carried out using oligonucleotides 5'- CCGCTCGAGATGGCTGATTATCCT-3' and 5'- ATAGTTTAGCGGCCGCCTTCCAATTCTTCATC-3', introducing *XhoI* and *NotI* sites to enable subcloning in expression vector pSLF172, and the reaction was done using a mix of *Vent* and *Taq* polymerase to enable TA cloning.

Deletion cassette of *hsp104* was obtained by amplifying the gene plus 1kb flanking region on each side using oligonucleotides 5'- -3' and 5'- -3'. The PCR product was then cloned in plasmid XL TOPO and was subjected to digestion using *AgeI* and *PacI* restriction enzymes producing the deletion of the entire gene. Oligonucleotides 5'- -3' and 5'- -3' were used to amplify *neo*^R containing *AgeI* and *PacI* restriction sites. The PCR product was then cloned into the digested vector producing the deletion cassette that could be finally isolated using *XhoI* digestion

Southern blot analysis.

Genomic DNA extractions and DNA-DNA hybridisation were as previously described

^{33,36}. Two probes were used in this study. The first was specific to the 400 bp 3' region of *cnx1* comprised between the *Clal* and *BamHI*, and it was obtained by digestion of pSPCA3261 ²². The second one was the linearised pREP41 vector.

Plasmid segregation experiments.

S. pombe strains bearing one or two plasmids were grown for 6 days at 30°C in 5 ml liquid EMM supplemented with adenine (Ade), uracil (Ura) and leucine (Leu) to chase the containing pREP42-based (*ura4* marker) and/or pREP41-based (*LEU2* marker) plasmid(s). Cells were plated onto EMM+Ade+Ura+Leu, EMM+Ade+Ura, EMM+Ade and EMM+Ade+Leu. Phenotypes of the cells for uracil and/or leucine auxotrophy were then analysed after 2-3 days of growth at 30°C and statistical values for plasmid loss were calculated.

Cell extract preparation and transfection.

Protein extracts for immunoblotting were prepared as previously described ³⁷. Lysates for transformation were made using spheroplast prepared as described previously ²². Briefly, lysates were prepared by resuspending the cells in 2 ml lysis buffer (0.1 M sorbitol, 20 mM HEPES, 50 mM potassium acetate, pH 7.4) containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride: PMSF, 10 mM iodoacetamide, 300 µg/µl pepstatin A, 300µg/ml leupeptin, 300mg/ml phenantroline) and homogenising in a Potter-Elvehjem homogeniser 25 times. Clumps of unbroken cells were discarded by centrifugation at 2000 rpm for 5 minutes at 4°C. The cleared lysate was then centrifuged at 15000 rpm, and the supernatant was designated as the soluble fraction. The pellet was resuspended in

lysis buffer and was designated as the insoluble fraction. Both the pellets and supernatants were digested with DNaseI (10µg/ml) and RNaseA (10µg/ml), at 37°C for 3 hours. *S. pombe* transformation with protein extracts was carried out using two methods: a variation of the lithium-acetate-PEG protocol³⁸ and a liposomal method (DOTAP, N-[1-2(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate); according to the manufacturer's instructions Roche Molecular Biochemicals #1811177). Soluble and insoluble protein fractions were individually transformed into WT (#2) cells. Briefly, for LiAc-PEG technique, 1ml of mid-log WT (#2) cells were pelleted, 5µg of proteins were added and mixed by gentle vortexing. A 500 µl volume of sterile PLATE medium (40.5% PEG 3350, 100 mM lithium acetate, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) was added and cells were incubated at room temperature for 24-48 hours. Cells were then washed in EMM+Ade+Ura+Leu three times and diluted in the same medium containing 2% glucose for plasmid segregation assay. For transformation with the DOTAP liposomal reagent, WT (#2) cells (1×10^6 cells) were spheroplasted, as described above, resuspended in fresh EMM+Ade+Ura+Leu, transformed with 100 µl of mixture containing DOTAP reagent and 5 µg of proteins, followed by incubation for 16 hours. The DOTAP-proteins mixture was obtained by incubating at room temperature for 20 minutes the proteins with 30 µg DOTAP reagent in a 100 µl final volume of HBS buffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4). Finally cells were washed and resuspended in fresh EMM+Ade+Ura+Leu and plasmid segregation assay was then carried out. For proteinase K digestions, the protein extracts were prepared as described above but using buffer A (25 mM tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5%

glycerol) as described in Paushkin, SV *et al.*, 1997. Digestions with proteinase K were carried out for 2 hours at 37°C at 4 µg/ml final enzyme concentration.

Calcofluor staining of the cell wall and confocal microscopy. Calcofluor-white staining was carried out as described previously ²². Indirect confocal immunofluorescence was carried out using standard formaldehyde fixation essentially as described in: <http://www.bio.uva.nl/pombe/handbook/section4/section4-2.html>. Primary antibody was used at a dilution of 1:50 for anti-BiP, or 1:100 for ant-Cnx1p. Secondary antibody FITC-conjugated anti-rabbit IgG at a 1:50 dilution was incubated overnight.

Acknowledgments: We thank Fadi Hajjar, Alexandre Marechal, and Pierre-Luc Tanguay for critical reading of the manuscript. We also wish to thank Manon Moreau for help with the figures and C. Tembo for typing the manuscript. This work was supported by grants from The Medical Research Council of Canada (L.A.R).

REFERENCES

1. Fink, A.L. & Goto, Y. Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins. Structure, Function and Mode of Action. Marcel Dekker, Inc., New York (1998).
2. Leitzgen, K. & Haas, I.G. Protein maturation in the endoplasmic reticulum. *Biochem. Mol. Biol.* **11**, 423-445 (1998).
3. Ellis, R.J. & Hartl, F.U. Principles of protein folding in the cellular environment. *Cur. Opin. Struc. Biol.* **9**, 102-110 (1999).
4. Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. & Craig, E.A. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**, 119-122 (2000).
5. Kuznetsov, G. & Nigam, S.K. Folding of secretory and membrane proteins. *New Eng. J. Med.* **339**, 1668-1695 (1998).
6. Prusiner, S.B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13363-13383 (1998).
7. Liebman, S.W. & Derkatch, I.L. The yeast (*PSI⁺*) prion: making sense of nonsense. *J. Biol. Chem.* **274**, 1181-1184 (1999).
8. Wickner, R.B. *et al.* Prions in *Saccharomyces* and *Podospora* spp.: Protein-based inheritance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 844-861 (1999).
9. Serio, T.R. & Lindquist, S.L. [*PSI⁺*]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 661-703 (1999).
10. True, H.L. & Lindquist, S.L. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* **407**, 477-483 (2000).
11. Fernandez-Bellot, E., Guillemet, E. & Cullin, C. The yeast prion (*URE3*) can be greatly induced by a functional mutated *ure2* allele. *EMBO J* **19**, 3215-3222 (2000).
12. Eaglestone, S.S., Cox, B.S. & Tuite, M.F. Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *EMBO J* **18**, 1974-1981 (1999).
13. Serio, T.R. & Lindquist, S.L. Protein-only inheritance in yeast: something to get [*PSI⁺*]-ched about. *Trends Cell Biol.* **10**, 98-105 (2000).
14. Eaglestone, S.S., Ruddock, L.W., Cox, B.S. & Tuite, M.F. Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant (*PSI⁺*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 240-244 (1999).

15. Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtonov, S.G. & Liebman, S.W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi*⁺]. *Science* **268**, 880-884 (1995).
16. Newnam, G.P., Wegrzyn, R.D., Lindquist, S.L. & Chernoff, Y.O. Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1325-1333 (1999).
17. Williams, D.B. The Merck Frosst award lecture 1994: Calnexin, a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 123-132 (1995).
18. Helenius A. & Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369 (2001).
19. Jannatipour, M. & Rokeach, L.A. The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J. Biol. Chem.* **270**, 4845-4853 (1995).
20. Parlati, F., Dignard, D., Bergeron, J.J.M. & Thomas, D.Y. The calnexin homologue *cnx1*⁺ in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J.* **14**, 3064-3072 (1995).
21. Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M.A. & Williams, D.B. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* **37**, 3480-3490 (1998).
22. Elagöz, A., Callejo, M., Armstrong, J. & Rokeach, L.A. Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved domain is dispensable for viability. *J. Cell Sci.* **112**, 4449-4460 (1999).
23. Chua, G., Taricani, L., Stangle, W. & Young, P.G. Insertion mutagenesis based on illegitimate recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **28**, E53 (2000).
24. Zeyl, C. & DeVisser, J.A.G.M. Estimates of the rate and distributions of fitness effects of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**, 53-61 (2001).
25. Singer, M.A. & Lindquist, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol. Cell* **1**, 639-648 (1998).
26. Silberstein, S., Schlenstedt, G., Silver, P.A. & Gilmore, R. A role for the DnaJ homologue Scj1p in protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **143**, 921-933 (1998).
27. Zarate, V. & Belda, F. *Schizosaccharomyces pombe* fragile mutants as a host for heterologous protein production. *J. Biotechnology* **54**, 121-129 (1997).

28. Sparrer,H.E., Santoso,A., Szoka Jr.,F.C. & Weissman,J.S. Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast [*PSI*⁺] factor by in vitro converted Sup35 protein. *Science* **289**, 595-599 (2000).
29. Caspi,S. *et al.* The anti-prion activity of Congo red. *J. Biol. Chem.* **273**, 3484-3489 (1998).
30. Jung,G. & Masison,D.C. Guanidine hydrochloride inhibits Hsp104 activity in vivo: a possible explanation for its effect in curing yeast prions. *Current Microbiol.* **43** , 7-10 (2001).
31. Wickner,R.B., Edskes,H.K., Maddelein,M.L., Taylor,K.L. & Moriyama,H. Prions of yeast and fungi. *J. Biol. Chem.* **274**, 555-558 (1999).
32. Sondheimer,N., Lopez,L., Craig,E.A. & Lindquist,S. The role of Sis1 in the maintenance of the [*RNQ*⁺] prion. *EMBO J.* **20** , 2435-2442 (2001).
33. Moreno,S., Klar,A. & Nurse,P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth. Enzymol.* **194**, 795-823 (1991).
34. Maundrell,K. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-130 (1993).
35. Müller,S., Sandal,T., Kamp-Hansen,P. & Dalbøge,H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Klyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**, 1267-1283 (1998).
36. Sambrook,J., Fritsch,E.F. & Maniatis,T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).
37. Jannatipour,M., Callejo,M., Parodi,A.J., Armstrong,J. & Rokeach,L.A. Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *S. pombe*. *Biochemistry* **37**, 17253-17261 (1998).
38. Elbe,R. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**, 18-19 (1992).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous présentons un phénomène sans précédent qui permet à la levure *Schizosaccharomyces pombe* de vivre en l'absence d'un gène essentiel. Nous montrons que Cnx1p, une chaperonne moléculaire essentielle du RE de *S. pombe*, est devenue non-essentielle pour les cellules et que ce mécanisme de survie possède des propriétés ressemblant aux prions de levure [*URE3*] et [*PSI*⁺]. La survie des cellules en absence de Cnx1p est vérifiée par des études de ségrégation plasmidique (ou « plasmid loss »), où il est possible de visualiser la perte de plasmides, portant *cnxI*⁺, par des cellules ayant une délétion génomique de *cnxI*⁺. Comme nous l'avons mentionné plus haut, ce phénomène de perte d'essentialité possède des propriétés rappelant celles des prions de levure telles que *i*) la dominance par rapport au gène sauvage, *ii*) le « curing » en présence de 5 mM Gu-HCl et *iii*) la réversibilité du « curing » avec la réapparition de cellules sans plasmides *cnxI*⁺, suite à la transformation du mutant #4. Aussi, comme Sparrer et al. l'ont fait pour [*PSI*⁺] (Sparrer, 2001), nous avons montré que la perte de *cnxI*⁺ était un phénomène infectieux qui pouvait être transmis par transformation d'extraits protéiques traités aux UV, aux nucléases et digéré ou non à la protéinase K, ce qui met en évidence un certain aspect non-Mendélien du phénomène.

Un modèle montrant l'apparition et la survie des cellules *cnxI*⁻

Nous avons proposé un modèle expliquant ce phénomène qui nous donne un point de départ pour vérifier nos hypothèses. Dans ce modèle simplifié, nous faisons intervenir deux composantes principales, à savoir le gène *scx1*, qui complémente la perte de *cnx1*⁺, et *cip1* le gène dont nous pensons que la protéine possède des propriétés s'apparentant aux prions. Selon notre modèle, *cip1*, en partie sous le contrôle de Cnx1p via sa queue cytosolique, agit soit comme répresseur direct de *scx1* ou via d'autres éléments par des interactions génétiques. Dans le scénario du mutant Cnx1p #4, pour des raisons probablement rattachées aux changements structuraux de Cnx1p mutante, Cip1p devient altéré et la répression de *scx1* s'atténue. La raison principale qui nous pousse à penser que Cnx1p a un certain contrôle sur Cip1p provient du fait qu'il nous a été impossible de répéter le phénomène de perte de plasmide lorsque nous avons enlevé la partie cytosolique du mutant Cnx1p #4. L'expression constitutive de *scx1* mène alors à l'apparition de cellules *cnxI*⁻, dans des conditions où on ne sélectionne pas pour l'épisme, due au fait que Scx1p peut complémenter la fonction essentielle de Cnx1p. Dans ces mêmes cellules, Cip1p^C est converti en Cip1p^{Sc} ce qui permet à cette nouvelle voie de survie de se poursuivre et de propager suite à la division cellulaire. Une question que l'on peut se poser est la suivante : pourquoi le mutant Cnx1p #4 et pas, par exemple, le mutant *mini_cnx1* ? Une réponse pourrait être qu'il existe une certaine « allostérie » entre la partie luminale et la partie cytosolique de Cnx1p, c'est-à-dire que des changements conformationnels dans la partie luminale pourraient modifier la conformation de la queue cytosolique. Il a été montré que le niveau de phosphorylation de la partie cytosolique de la calnexine de mammifères pouvait être altéré en fonction de la

concentration en calcium dans le RE (Roderick, 2000). Comme Cnx1p lie le calcium, et qu'il a été montré que ce dernier pouvait influencer l'interaction entre la calnexine et les autres chaperonnes du RE (Corbett, 1999), il serait possible de spéculer, en se basant sur les résultats de ces deux groupes, qu'un changement en Ca^{2+} modifie la structure de Cnx1p et que ce changement altère, non-seulement ses interactions protéine-protéine, mais aussi son niveau de phosphorylation. Donc on pourrait imaginer que, dans un cas de changements conformationnels de Cnx1p particuliers, tels que des délétions, la queue pourrait être phosphorylée ou déphosphorylée de façon constitutive menant ainsi à des signaux aberrants. Dans notre cas, quand on examine la structure cristallographique de Cnx1p, on se rend compte que le Cnx1p #4 correspond à une reconstitution du domaine globulaire, alors que la mini_Cnx1p, elle, ne correspond qu'à une partie du domaine globulaire. Les différences pour ces deux molécules, pourrait mener à des changements conformationnels différents dans leurs parties cytosoliques et ainsi qu'à une signalisation très particulière. Dans cette veine, de nouvelles données suggèrent que l'implication des chaperonnes moléculaires, dans l'apparition et la propagation des prions, ne se fait pas toujours via des domaines directement impliqués dans le repliement des protéines. En effet, il a été montré, chez *S. cerevisiae*, qu'un mutant de délétion du domaine G/F de la chaperonne moléculaire Sis1p, une Hsp40, n'était plus capable de produire ni de propager le nouveau prion [*RNQ⁺*] (Sondheimer, 2001).

Si l'apparition de cellules *cnx1⁻* est causée par un élément cellulaire ayant des propriétés s'apparentant aux prions, il serait intéressant de voir l'effet de chaperonnes moléculaires cytosoliques sur ce phénomène. Nous avons trouvé, dans les banques de données, une protéine de *S. pombe* (O94641) qui est similaire à Hsp104p de *S. cerevisiae* et nous avons cloné la séquence d'ADN codant pour cette protéine, dans un vecteur de surexpression sous le contrôle du promoteur *nmt1* (thiamine). Nous avons mis cette construction dans la souche *cnx1^{-/+}* et nous sommes en train de comparer les différences dans la fréquence de perte de l'épisome codant pour *cnx1⁺*. Des résultats préliminaires semblent indiquer que la surexpression de *hsp104* ne permet pas le « curing » du phénomène de perte de l'épisome contenant *cnx1⁺* dans les cellules *cnx1^{-/+}*. Malgré que chez *S. cerevisiae*, la surproduction Hsp104p diminue grandement l'apparition de cellules [*PSI⁺*] (Chernoff, 1995), il a été montré clairement que cette chaperonne n'affectait pas la propagation de [*URE3*] (revu dans Wickner, 1999), ce qui suggère que la surproduction de Hsp104p n'ait pas des propriétés anti-prion universelles. Parce que nous ne sommes pas très sûr de l'efficacité d'expression du promoteur *nmt1*, qui peut être réprimé naturellement par les cellules, nous sommes aussi en train d'effectuer une délétion génomique du gène *hsp104* dans *S. pombe*. L'étude, par « plasmid loss », de la délétion de *hsp104* dans la souche *cnx1^{-/+}*, nous permettra de vérifier de façon décisive si ce gène a un effet ou non sur l'apparition de perte de l'épisome contenant *cnx1⁺*.

Dans notre étude, nous avons qualifié l'apparition de cellules *cnxI⁻* comme un phénomène dominant et non-mendélien. Même si nous montrons que la perte de plasmide persiste dans les expériences où on retransforme l'épisome codant pour *cnxI⁺* dans les cellules *cnxI⁻*, on pourrait toujours argumenter sur le fait qu'il ne s'agisse pas d'une dominance par rapport au gène sauvage, mais plutôt d'une dominance par rapport à l'épisome. Mais comme les seules copies de *cnxI⁺* disponibles pour les cellules se trouvent sur ce plasmide, nous sommes confiants dans notre association entre *cnxI⁺* et le vecteur. Afin de vérifier génétiquement si notre phénomène de perte de *cnxI⁺* est bien dominant, nous avons créé une souche diploïde, à partir de cellules *cnxI⁻* et de cellules de type sauvage (#2), que nous sommes en train d'analyser par « plasmid loss ». Même si nous avons montré que le phénomène d'apparition de cellules *cnxI⁻* était infectieux, par les études de transfections d'extraits protéiques traités de manière à éliminer toutes traces d'acides nucléiques, nous n'avons pas encore été en mesure de fournir des preuves quant à l'existence d'un transfert d'une composante non-mendélienne. Comme nos efforts de purification de cette composante(s) n'ont pas porté fruit, pour l'instant, nous sommes en train de faire une étude génétique basée sur des analyses de tétrades du diploïde mentionné plus haut. Vu que les quatre spores de ces tétrades contiennent une délétion génomique de *cnxI* et un épisome complétant celle-ci, il nous sera possible de faire des études par « plasmid loss » afin de vérifier, sans équivoque, que la survie de *S. pombe*, sans calnexine, est bien un phénomène non-mendélien. En effet, si tel est le cas, nous nous attendons à ce que une, trois ou quatre spores soit capables de perdre le plasmide contenant *cnxI⁺*.

La redondance des prions dans la nature

Les prions donnent une opportunité remarquable à des cellules aux génomes identiques d'exprimer des variations héréditaires de phénotypes. Cette plasticité phénotypique suscite un grand nombre de questions, notamment au niveau de l'utilité de prions dans la nature. Chez *S. cerevisiae*, [URE3] et [PSI⁺] ont été découverts et étudiés, grâce à des criblages génétiques parce qu'ils n'obéissaient pas aux lois Mendéliennes. Grâce aux critères établis par Wickner, de nouveaux éléments non-Mendéliens ont été découverts. C'est le cas de [Het-s], un facteur épigénétique impliqué dans l'incompatibilité de conjugaison chez le champignon filamenteux *Podospora anserina* (Coustou, 1997; revu dans Wickner, 1999), et [PIN⁺], chez *S. cerevisiae*, établi comme un trait non-Mendélien requis dans l'apparition *de novo* du prion [PSI⁺], mais aussi [ISP⁺], un nouveau prion impliqué dans le contrôle de la fidélité de la traduction chez *S. cerevisiae* (Volkov, 2002). Plusieurs groupes tentent, à présent, d'utiliser des stratégies basées sur les caractéristiques protéiques, plutôt que la génétique, pour aller pêcher des nouveaux candidats de prions (Sondheimer, 2000). Ces stratégies font appel à des algorithmes qui alignent les séquences des domaines de formation de prion (PrD) des éléments déjà connus comme Sup35p et Ure2p. Des résultats préliminaires ont permis d'identifier plusieurs candidats dont Rnq1p et New1p (Sondheimer, 2000; Santoso, 2000). [RNQ⁺] a été montré comme un élément dominant, pouvant être insoluble, qui peut se transmettre par cytoduction. Rnq1p est maintenant connu comme le déterminant de l'état [PIN⁺] (Derkatch, 2001) montrant que cette nouvelle approche se révèle efficace. Dans le cas de New1p, il a été montré qu'une chimère de sa région riche en Gln/Asn (PrD) avec le domaine C-terminal de Sup35p (EF), lorsque surproduite,

permettait l'apparition [*PSI*⁺] ainsi que la formation de particules insolubles *in vivo* et *in vitro* (Santoso, 2000). L'intérêt principal à vouloir isoler différentes protéines aux propriétés de prions réside dans le fait que les mécanismes de conversion et de propagation de ces éléments sont encore incompris.

Le mécanisme par lequel ces régions PrDs permettent la conversion et la propagation des prions commencent à être connus, alors que plusieurs nouvelles études montrent l'existence d'une barrière des espèces dans la propagation des prions (Santoso, 2000 et revu dans Tuite, 2000). En effet, dans ces études, les domaines PrD de Sup35p provenant de plusieurs espèces de levures, incluant *Candida albicans* (CaSup35p), *Pichia methanolica* (PmSup35p) et *Kuyvermyces lactis* (KlSup35p), ont été clonés et fusionnés au domaine fonctionnel (EF) de Sup35p de *S. cerevisiae* (ScSup35p) et à la GFP. Grâce à un essai à deux plasmides, il a été possible de montrer que l'apparition d'agrégats fluorescents n'advenait que lorsque étaient exprimées des fusions homotypiques de PrD (par exemple PrDM_{*Candida albicans*}-GFP avec PrDM_{*Candida albicans*}-EF), montrant que les PrDs étrangers peuvent permettre un hérité de type prion, mais qu'une barrière empêche les croisements des PrDs de différentes espèces dans la propagation (Figure 18). Cette barrière entre les espèces, qui est aussi commune aux prions de mammifères (Prusiner, 1998), permet d'émettre de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes de propagation des prions. En effet, les données fournies par les groupes de Lindquist et Weissman, semblent montrer que, dans le cas du prion de levure [*PSI*⁺], la barrière des espèces provient d'une spécificité remarquable dans l'interaction de la protéine prion, médiée par des épitopes très définis dans le PrD. Des criblages pour des mutants dans

PrD ont permis de trouver des mutations, qui permettaient le « curing » de [*PSI*⁺], qui sont localisées entre les résidus 8 et 26 du domaine PrD (DePace et al. 1998).

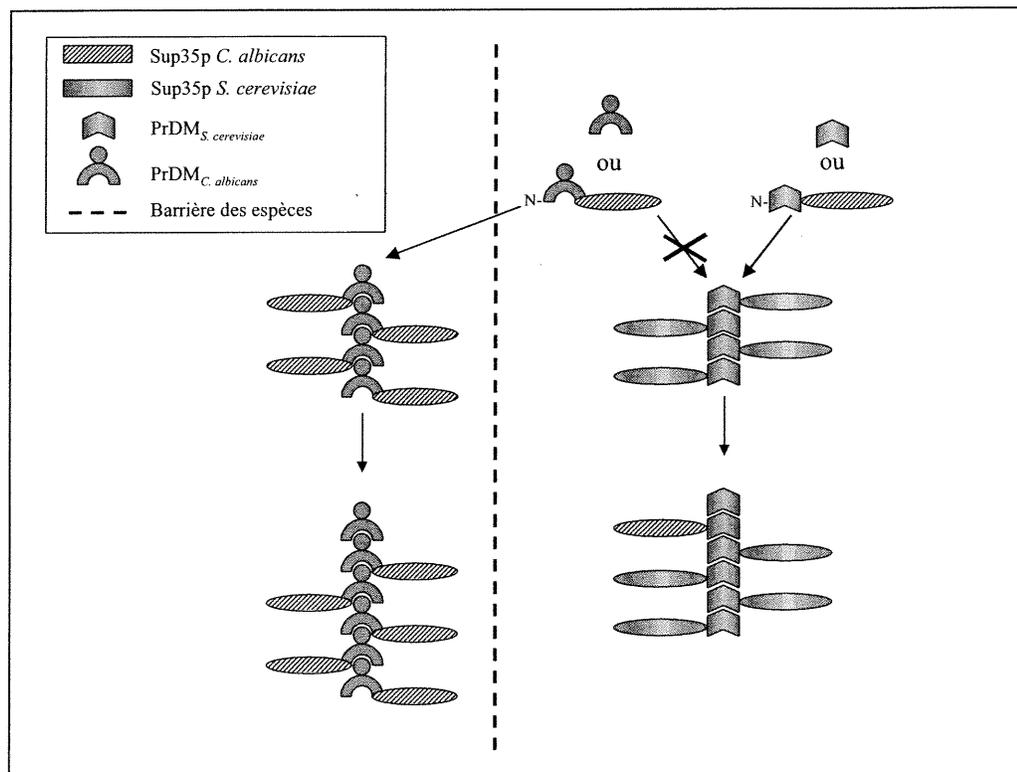


FIGURE 18. Modèle hypothétique expliquant la barrière des espèces dans le formation des prions. Selon les études de Santoso et al., les domaines PrD sont perçus comme les éléments critiques qui interagissent entre eux, de façon espèce-spécifique, donnant lieu au recrutement de nouveaux monomères dans la formation de fibres amyloïdes. Dans ces études, il a été montré que le seul moyen, permettant la polymérisation de Sup35p provenant de différentes espèces, était de fusionner le PrD de l'espèce hôte au domaine C-terminal du Sup35p étranger.

Les prions sont-ils utiles ?

Même si on commence à comprendre la dynamique générale par laquelle les prions, et de façon plus générale les amyloïdes, se propagent dans les cellules ou *in vitro* (Glover, 1997 ; Liu, 1999 ; Scheibel, 2001), il n'en reste pas moins que plusieurs questions restent à éclaircir, notamment au niveau de l'utilité des ces phénomènes cellulaires et le moins que l'on puisse dire est que le débat est encore très ouvert. Quand on compare les différents exemples de prions, on se rend compte à première vue qu'il n'y a aucune utilité, pour des cellules, de faire apparaître ce genre de phénomène. En effet, chez les mammifères, les prions sont pathogènes vue leurs effets dévastateurs dans les TSEs. Chez *S. cerevisiae*, [URE3] provoque une faible croissance sur des milieux contenant des bonnes sources d'azote, et les cellules [PSI⁺] semblent être beaucoup moins viable en phase stationnaire tardive (revue dans Wickner, 1996). D'autres auteurs, vont plutôt avoir tendance à faire remarquer le côté positif de la chose et vont dire que les cellules [URE3] ou [PSI⁺] sont des exemples d'adaptation sans précédent et où il est à noter que, dans un cas, les cellules réussissent à s'adapter pour trouver une autre source d'azote (l'USA), alors que, dans l'autre cas, il a aussi été montré que les cellules [PSI⁺] montraient une augmentation dans la thermo- et la chemo-tolérance (Eaglestone, 1999 ; revu dans Serio, 1999). Le Dr Lindquist a aussi suggéré que la polymérisation de Sup35p en fibres pourrait fournir un mécanisme d'adaptation qui changerait les patrons d'expression génique, en réponse à des changements environnementaux rapides, mais qu'il était important que ce mécanisme soit réversible (Lindquist, 1997; True, 2000). En réponse à ces suggestions, mais sans spéculer sur les fonctions éventuelles des prions, Peter Landsbury propose une hypothèse (Landsbury, 2002), aussi fascinante que curieuse

où les régions riches en Gln/Asn de Sup35p (PQGGYQQYN)₅, de PrP (PHGGGWGQ)₅ et de la Huntingtin (Q)₆₋₃₅, sont perçues comme des domaines « cordes de bungee ». Dans cette théorie, plutôt colorée, il présente l'utilité de ces régions comme un compromis entre la fonction prévue du « saut » (c'est-à-dire la vraie fonction des prions) et le désir de limiter le risque de « mort ». En rapport à cette métaphore, il suggère que si on ajoute des répétitions de motifs dans Sup35p, la perte du phénotype [*PSI*⁺] deviendrait beaucoup trop rare, alors que si on en enlevait, elle deviendrait trop courante (Figure 19). Bien qu'il semble assez insolite, à ce jour, la corde du bungee est un des seuls modèle qui propose l'utilité du phénomène de formation d'amyloïdes. Avec la découverte des mécanismes d'oligomérisation, ainsi que la découverte des fonctions reliées aux protéines qui tendent à polymériser, ce modèle devra être testé.

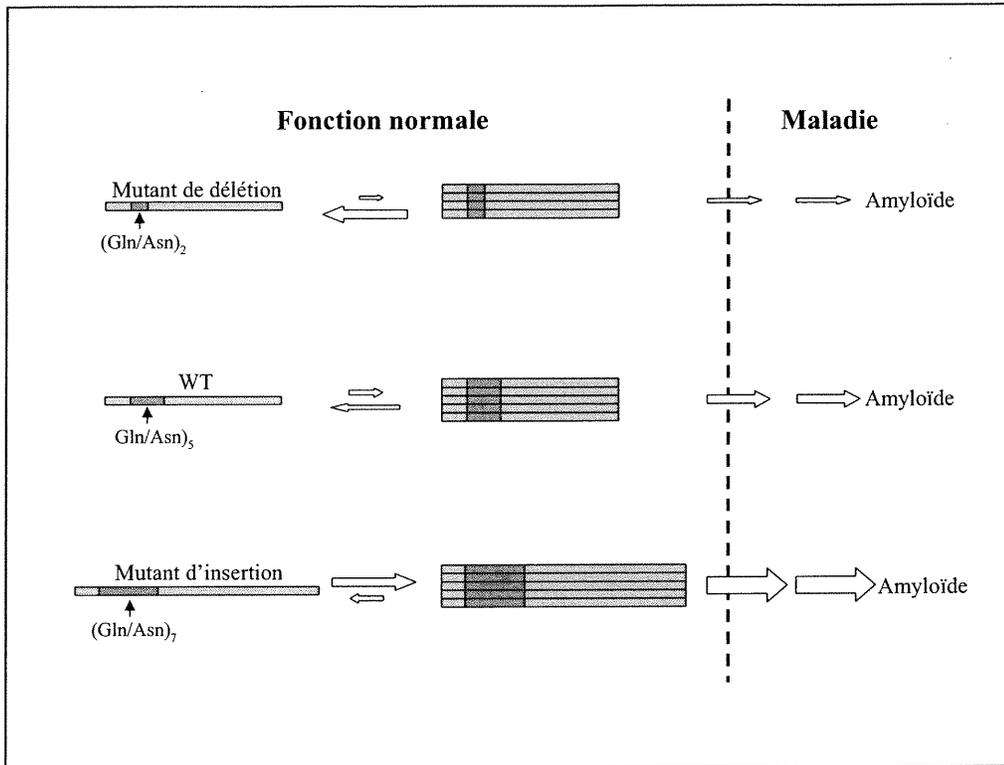


FIGURE 19. L'utilité des PrDs; le modèle de la corde de « bungee ». Même si la plupart du temps, la formation d'amyloïdes est associée avec une maladie, il n'en reste pas moins que certains scientifiques, dont Peter T. Lansbury, ce sont penchés sur l'utilité éventuelle de la formation de ces agrégats. Dans le modèle de la corde de « bungee », la fonction normale de ces protéines dépendrait de ces répétitions de séquences riches en Asn/Gln, expliquant, ainsi, pourquoi ces séquences, et leur nombre de copies, ont été retenues dans l'évolution. Selon Peter T. Lansbury, la quantité de ces séquences est dictée par l'équilibre entre la fonction normale de ces protéines et le fait de limiter l'agrégation irréversible menant à la maladie.

Conclusions et perspectives de recherche

Même si notre phénomène répond aux principaux critères émis par Wickner pour les prions de levure, il reste encore à prouver, de façon claire et nette, que la survie sans la calnexine est un phénomène médié par un prion. L'approche que nous avons choisie consiste en l'identification des éléments directement impliqués dans l'apparition de ce phénomène. Comme nous n'avons aucun indice quant à l'identité de ce/ces gènes, l'alternative est la génétique. En se basant sur le fait qu'un prion correspond à une délétion fonctionnelle de la protéine normalement repliée, nous pensons qu'il serait possible d'identifier cette dernière en déléant directement le gène dans le génome et en vérifiant le phénotype. En s'inspirant d'une technique du groupe du Dr Paul Young (Chua, 2000), nous avons développé un criblage génétique qui se base sur la délétion systématique et aléatoire de gènes. Brièvement, nous générons par PCR une cassette *ura4⁺* flanquée de régions aléatoires (16N) que nous transformons par la suite dans les cellules d'intérêt. Après sélection sur milieu sans uracile, nous récupérons les clones stables (environ 80-90% des clones de départ) et nous soumettons le tout à un essai de ségrégation plasmidique. Par replica, nous allons ensuite distinguer les cellules qui auront perdu *cnx1⁺* épisomal. Parce que nous travaillons avec une souche qui possède un plasmide codant pour la calnexine, il pourrait arriver d'obtenir des faux positifs où il y aurait une perte de plasmide accompagnée d'une intégration homologue ou non de *cnx1⁺* dans le génome. Pour contrer ceci, les clones qui auront perdu l'épisome codant pour *cnx1⁺* seront analysés par western blot afin de vérifier l'absence de production de Cnx1p. Une fois ce contrôle effectué, il sera alors possible de récupérer les séquences génomiques flanquant le site d'insertion de *ura4⁺* par PCR inverse (IPCR), et de les

identifier par séquençage ce qui donnera le locus d'insertion de *ura4*⁺. En utilisant cette stratégie, nous obtiendrons l'identité du gène *cip1* qui, quand il est délété, permet aux cellules de survivre en absence de *cnx1*⁺. En surexprimant *cip1* dans notre système génétique de type sauvage (*cnx1::his3* [*cnx1*⁺]), il sera possible de voir s'il cause la perte de *cnx1*⁺ ce qui permettra de vérifier le dernier critère de Wickner, à savoir que la surproduction d'une protéine ayant potentiellement des propriétés prion, favorise l'apparition du prion et de ces phénotypes. À ce jour, nous avons isolé quatre clones positifs sur 60.000 et les séquences sont en train d'être identifiées (Figure 20). Un criblage similaire est aussi en route pour isoler *scx1*, qui, selon notre modèle, remplit la fonction cellulaire essentielle de *cnx1*⁺. Nous pensons qu'il est possible, en faisant la délétion aléatoire de gènes, d'obtenir des souches *cnx1*^{-/+} qui ne seront plus en mesure de perdre *cnx1*⁺ épisomal (Figure 21). Comme la fréquence de perte de la calnexine, lors de « plasmid loss » dans la souche *cnx1*^{-/+}, est très stable (environ 70% des cellules), nous considérons qu'il s'agit d'un phénotype des cellules *cnx1*^{-/+}. Un des grands intérêts de ce criblage est qu'il nous permettra non-seulement d'isoler *scx1*, la composante primaire de la complémentation de *cnx1*⁺, mais aussi d'identifier les principales composantes d'une cascade qui semble mener à une voie alternative de survie. En effet, si dans le cas de *scx1*, on s'attend à une suppression totale de la perte de la calnexine dans *cnx1*^{-/+}, dans les composantes intermédiaires, il devrait être possible de distinguer des fréquences différentes de perte de *cnx1*⁺ dépendamment de l'importance du facteur dans la cascade. Le succès de ce criblage aura des conséquences très importantes dans la mesure où il permettra de déterminer la/les fonction(s) essentielle(s) de *cnx1*⁺ chez *S. pombe*.

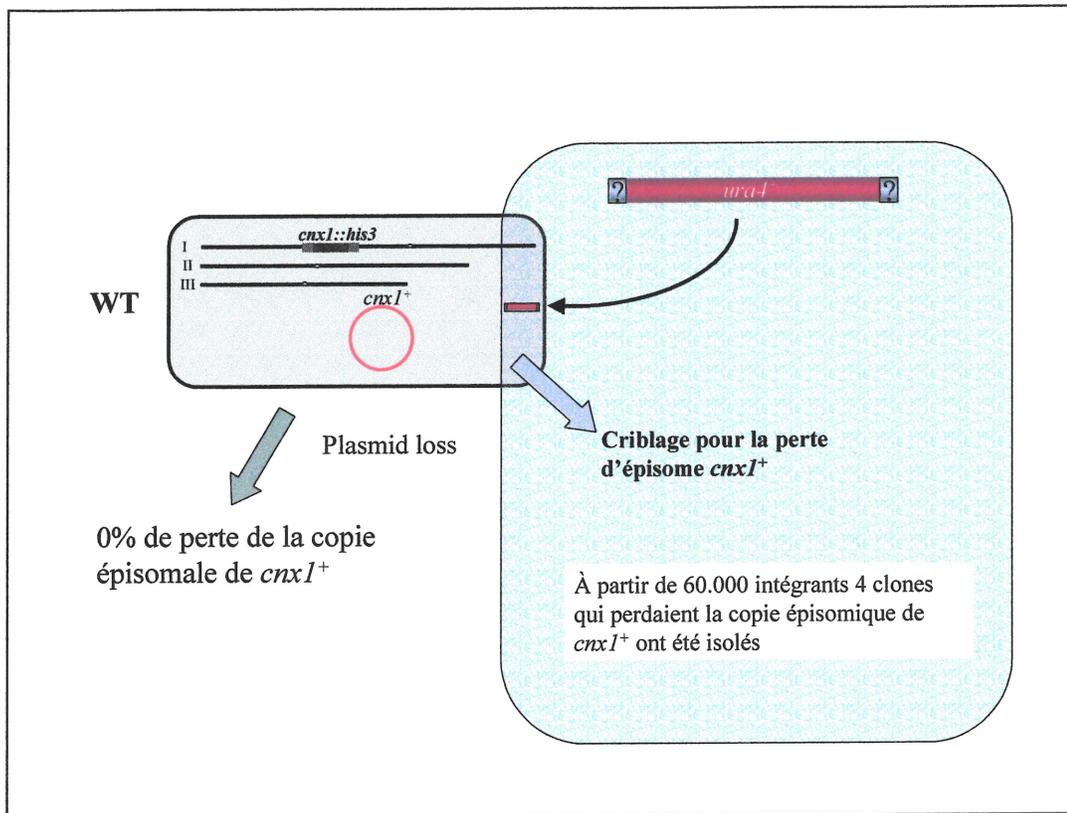


FIGURE 20. Criblage génétique pour le gène *cpl1*, ayant des propriétés de type prion. Parce que un prion correspond à une délétion fonctionnelle d'un gène, nous avons mis sur pieds un criblage basé sur la délétion aléatoire de gènes de *S. pombe*. Dans ce criblage, nous allons transformer des cassettes contenant le gène *ura4*, flanqué de régions aléatoires, dans notre souche sauvage (WT), qui ne perd jamais l'épisome, contenant *cnx1⁺*, lors d'études de « plasmid loss ». De 60.000 transformants, nous avons été en mesure d'isoler 4 clones qui perdent la copie épisomale de *cnx1⁺*.

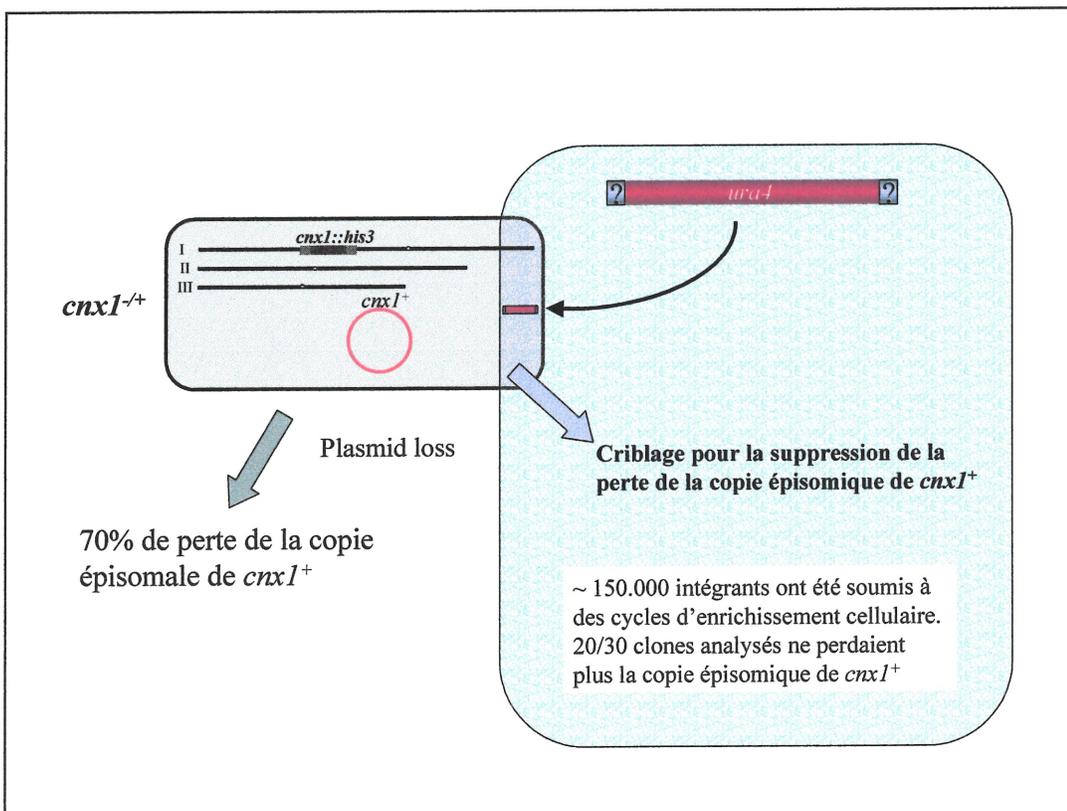


FIGURE 21. Criblage génétique pour le gène *scx1*, complétant *cnx1⁺*, dans les cellules *cnx1^{-/+}*. Dans notre modèle, expliquant le phénomène de perte d'un gène essentiel, nous mentionnons l'existence d'un autre gène qui est capable de compléter la/fonction(s) essentielle(s) de la calnexine. En utilisant un criblage génétique, basé sur la délétion aléatoire de gènes, il sera possible d'isoler des cellules *cnx1^{-/+}* qui ne perdent plus la copie épisomale de *cnx1⁺*. À partir d'un « pool » de 150.000 clones qui a été soumis à des cycles d'enrichissement cellulaire, nous avons analysé 30 clones par « plasmid loss » et 20 clones ne perdaient plus l'épisome *cnx1⁺*.

Une fois que nous aurons trouvé ce que nous considérons comme le gène codant pour le prion, de nombreuses études biochimiques et génétiques débiteront. Tout d'abord, il faudra confirmer qu'il s'agit bel et bien d'une protéine qui existe sous deux formes, la forme soluble, mais aussi la forme insoluble. Pour se faire, nous allons procéder à des études de sédimentation par ultracentrifugation (Paushkin, 1997) et où nous allons comparer les extraits protéiques de souches sauvages par rapport à ceux des *cnx1⁻*, en mesurant les quantités de protéines se retrouvant dans le surnageant et dans le culot. À moins que des anticorps ait été produits pour cette protéine, les études se feront grâce à des vecteurs d'expression qui possèdent des épitopes tels que *c-myc* ou HA, et la détection des protéines se fera grâce à des anticorps monoclonaux pour ces épitopes. Nous allons aussi tenter d'effectuer des études sur la formation de fibres amyloïdiques, où il sera possible de vérifier *in vivo* la présence de tels agrégats par de la microscopie électronique et à l'aide d'anticorps couplés à des billes d'or colloïdal. Avec des protéines purifiées, il sera possible d'effectuer des études de propagation *in vitro* grâce à la propriété des fibres amyloïdes de lier l'agent intercalant Congo Red. Les complexes Congo Red-amyloïdes seront détectés et visualisés par microscopie de fluorescence. Bien qu'il sera possible d'enligner une grande quantité de données biochimiques regardant la formation de particules insolubles, seul la génétique nous permettra de bien comprendre ce phénomène. Les études génétiques consisteront, principalement, en des criblages de banques d'ADNc de *S. pombe* et, éventuellement, d'autres organismes, qui nous permettront de trouver des éléments suppresseurs ou activateurs qui modulent l'apparition, la propagation ou la disparition de notre phénomène. Comme l'homologue Hsp104p de *S. pombe* ne semble pas influencer la propagation du phénomène de perte de

plasmide (cf. résultats), nous espérons trouver de nouvelles chaperonnes moléculaires qui le feront. Ce genre d'études nous permettra aussi de vérifier les gènes issus du criblage de *scx1* par délétions aléatoires.

Comme notre phénotype principal est la perte de plasmide arborant *cnx1*⁺, nous faisons face à plusieurs contraintes de taille, à savoir que la vérification du phénomène nécessite des replica et que nous allons donc être limité par le temps et par la quantité de clones à tester. Pour éviter ce genre de problème, nous sommes en train de développer un essai colorimétrique qui nous permettra de distinguer, directement sur un pétris, les colonies ayant perdu *cnx1*⁺. Cet essai est basé sur l'expression d'un gène rapporteur situé sur le plasmide contenant *cnx1*⁺. Nous allons insérer dans pREP41-*cnx1*⁺ lacZ (le gène codant pour la β -Galactosidase) et il sera alors possible de vérifier la perte de plasmide, suite au « plasmid loss », directement sur des pétris de milieu minimal contenant de l'X-Gal (Figure 22). Parce que nous ne voulons pas biaiser notre essai, il est très important de choisir un promoteur adéquat pour la production de la β -Galactosidase. En effet, si l'expression est trop forte, il se peut que la protéine ait un effet toxique dans le cytoplasme de nos cellules et que ces dernières décident de se débarrasser autant que possible de ce vecteur. Pour éviter ce genre de problèmes, nous avons choisi le promoteur SV40, dont la force d'expression est loin d'être excessive chez *S. pombe*. Dans cet essai, les cellules qui auront gardé le plasmide seront bleues, alors que celles qui l'auront perdu seront blanches (Figure 22). Comme il existe à l'heure actuelle des programmes informatiques qui sont capables de lire et de différencier les couleurs des colonies, il nous sera possible d'adapter notre essai pour des études à grande échelle.

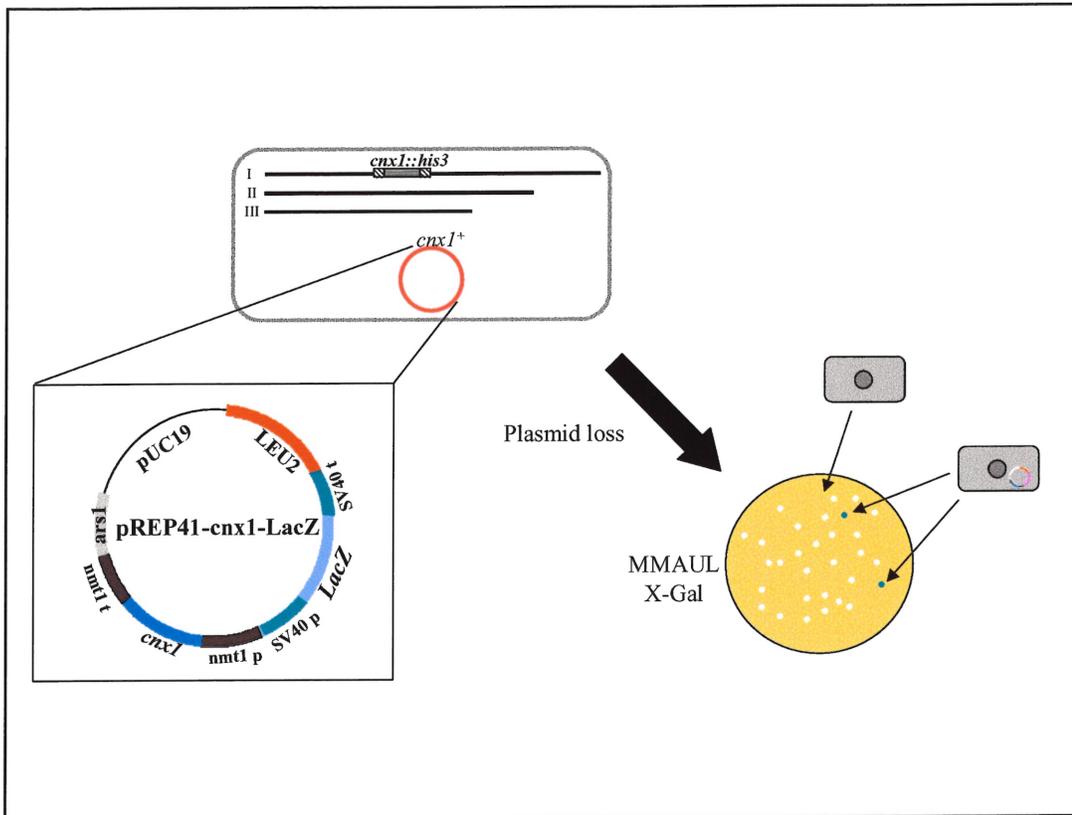


FIGURE 22. Simplification de l'essai « plasmid loss » grâce à un criblage bleu-blanc. Dans ce criblage, au lieu d'utiliser des marqueurs d'auxotrophie, qui pourrait biaiser notre essai, nous utilisons le gène rapporteur codant pour la β -galactosidase. Afin de limiter les dégâts liés à l'expression hétérologue, nous clonerons le gène dans pREP41-cnx1 avec le promoteur SV40 qui est de force moyenne chez *S. pombe* et qui est constitutif. Dans le « plasmid loss », les cellules qui auront perdu l'épisome seront blanches alors que celles qui l'auront gardé seront bleues.

Rationnel

La découverte du premier prion chez *S. pombe*, va nous permettre d'ouvrir de nouvelles pistes quant à la redondance de ce phénomène dans l'évolution, mais elle va aussi nous permettre de fournir un nouvel exemple de mécanisme d'adaptation chez les eucaryotes, suite à l'apparition d'un prion. L'étude des mécanismes d'apparition et de propagation de cet élément, avec la génétique, devrait nous permettre d'apporter de nouvelles données au niveau des facteurs qui y sont impliqués et ainsi en éclaircir la dynamique. Des études à grandes échelles récentes ont permis de cataloguer une infinité de phénotypes pour les cellules [*PSI*⁺] (Heather, 2000) et nous pensons qu'il serait possible d'utiliser la même approche pour cribler des agents (composés chimiques ou peptides mimétiques (Perrier, 2000)) permettant le « curing » de [*cnxI*⁻]. Une telle approche nous permettra, non seulement, de comprendre d'avantage le phénomène de « curing », mais aussi de cataloguer une quantité d'agents qui pourront servir de base pour le développement de médicaments pour les TSEs, mais aussi pour l'élaboration de nouveaux protocoles de décontamination pour le grand publique.

RÉFÉRENCES

- Abdulla, Y.H. A plausible function of the prion protein: conjecture and a hypothesis. *Bioassays*, **23**, 456-462 (2001).
- Aigle, M. & Lacroute, F. Genetical aspects of [*URE3*], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **136**, 327-335 (1975).
- Alper, T. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **22**, 278-284 (1966).
- Alper, T. & Cramp, W.A. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764-766 (1967).
- Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230 (1973).
- Basler, K. et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, **46**, 417-428 (1986).
- Beaulieu, H., Elagöz, A., Crine, P. & Rokeach, L.A. Interaction of mammalian neprilysin with binding protein and calnexin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. J.*, **340**, 813-819 (1999).
- Bolton, D.C., McKinley, M.P. & Pruisiner, S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, **218**, 1309-1311 (1982).
- Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, M.E., Goeckler, J.L., Kruse, K.B. & McCracken, A.A. The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J. Biol. Chem.*, **274** 3453-3460 (1999).
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. & Craig, E.A. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**, 119-122 (2000).

Caspi, S. *et al.* The anti-prion activity of Congo red. *J. Biol. Chem.* **273**, 3484-3489 (1998).

Chacinska, A. *et al.* Ssb1 chaperone is a [*PSI*⁺] prion-curing factor. *Curr. Genet.*, **39**, 62-67 (2001).

Chernoff, Y.O., Derkach, I.L., Dagkesamanskaya, A., Tikhomironva, V, Ter-Avanesyan, M. & Vechtomov, S. Nonsense-suppression by amplification of translational protein factor gene. *Dokl. Akad. SSSR*, **301**, 1227-1229 (1988).

Chernoff, Y.O., Derkach, I.L. & Inge-Vechtomov, S.G. Multicopy *SUP35* gene induces de novo appearance of *psi*-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **24**, 268-270 (1993).

Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S.G. & Liebman, S.W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi*⁺]. *Science* **268**, 880-884 (1995).

Chesebro, B. *et al.* Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, **315**, 331-333 (1985).

Chevet, E. *et al.* Phosphorylation by CK2 and MAPK enhances calnexin association with ribosomes. *EMBO J.*, **18**, 3655-3666 (1999).

Chevet, E., Cameron, P.H., Pelletier, M.F., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J.M. The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr Opin Cell Biol.*, **1**, 120-124 (2001).

Chien, P. & Weissman, J.S. Conformation diversity in a yeast prion dictates its seeding specificity. *Nature*, **410**, 223-227 (2001).

Chua, G., Taricani, L., Stangle, W. & Young, P.G. Insertion mutagenesis based on illegitimate recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **28**, E53 (2000).

Cohen, F.E., Pan, K.M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R.J. & Pruisiner, S.B. Structural clues to prion replication. *Science*, **264**, 530-531 (1994).

Corsi, A.K. & Scheckman, R. The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **137**, 1483-1493 (1997).

Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S. & Bergueret, J. The protein product of the *het-s* heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9773-9778 (1997).

Crofts, A., Lebrogne-Castel, N., Pesca, M., Vitale, A. & Denecke, J. BiP and calreticulin form an abundant complex that is independent of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell*, **10**, 813-823 (1998).

Degen, E. & Williemas, D.B. Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J. Biol. Chem.*, **112**, 1099-1115 (1991).

DePace, A.H. & Weissman, J.S. Origins and kinetic consequences of diversity in Sup35 yeast prion fibers. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 389-396 (2002).

Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Zhou, P., Chernoff, Y.O. & Liebman, S.W. Genetic and environmental factors affecting the *de novo* appearance of the [PSI⁺] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **147**, 507-519 (1997).

Derkatch, I.L., Bradley, Huang, J.Y. & Liebman, S.W. Prions affect the appearance of other prions: The story of [PIN⁺]. *Cell*, **106**, 171-182 (2001).

Derkatch, I.L. et al. Dependence and independence of [PSI⁺] and [PIN⁺]: a two-prion system in yeast? *EMBO J.*, **19**, 1942-1952 (2000).

De Virgilio, C., Bürkert, N., Neuhaus, J.-M., Bollet, T. & Wiemken, A. *CNE1*, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the genes encoding mammalian calnexin and calreticulin. *Yeast*, **9**, 185-188 (1993).

- Dobson, C.M. Protein misfolding, evolution and disease. *TIBS*, **24**, 329-332 (1999).
- Drickamer, K. & Taylor, M.E. Evolving views of protein glycosylation. *TIBS*, **23**, 321-324 (1998).
- Eaglestone, S.S., Cox, B.S. & Tuite, M.F. Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *EMBO J* **18**, 1974-1981 (1999).
- Eaglestone, S.S., Ruddock, L.W., Cox, B.S. & Tuite, M.F. Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [*PSI*⁺] of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 240-244 (1999).
- Elagöz, A., Callejo, M., Armstrong, J. & Rokeach, L.A. Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved domain is dispensable for viability. *J. Cell Sci.* **112**, 4449-4460 (1999).
- Elbe, R. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**, 18-19 (1992).
- Ellgard, L., et al. NMR structure of the calreticulin P-Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3133-3138 (2001).
- Ellgard, L. & Helenius, A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol.*, **4**, 431-437 (2001).
- Ellis, R.J. & Hartl, F.U. Principles of protein folding in the cellular environment. *Cur. Opin. Struc. Biol.*, **9**, 102-110 (1999).
- Epstein, F.H. Folding of secretory and membrane proteins. *New Engl. J. Med.*, **339**, 1688-1695 (1998).
- Fanchiotti, S. Fernandez, F., D'Alessio, C. & Parodi, A.J. The UDP-Glc:Glycosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under extreme endoplasmic reticulum stress. *J. Cell Biol.*, **143**, 625-635 (1998).

Fernandez, F., Jannatipour, M., Hellman, U., Rokeach, L.A. and Parodi, A.J., A new stress protein :synthesis of *Shizosaccharomyces pombe* UDP-Glc :glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability. *EMBO J.* **15**, 705-713(1996).

Fernandez-Bellot,E., Guillemet,E. & Cullin,C. The yeast prion (*URE3*) can be greatly induced by a functional mutated *ure2* allele. *EMBO J*, **19**, 3215-3222 (2000).

Fernandez-Bellot,E., Guillemet,E., Ness, F., Baudin-Baillieu, A., Tuite, M. &Cullin, C. The [*URE3*] phenotype : evidence for a soluble prion in yeast. *EMBO reports*, **3**, 76-81 (2002).

Ferreira, P.C., Ness, F., Edwards, S.R., Cox, B.S. & Tuite, M.F. The elimination of the yeast [*PSI*⁺] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. *Mol. Microbiol.*, **40**, 1357-1369 (2001).

Fewell, S.W., Travers, K.J, Weissman, J.S. & Brodsky, J.L. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Ann. Rev. Genet.*, **35**, 149-191 (2001).

Fink,A.L. & Goto,Y. Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins. Structure, Function and Mode of Action. Marcel Dekker, Inc., New York (1998).

Flynn, G.C, Pohl, J., Flocco, M.T. & Rothman, J.E. Peptide binding specificity of molecular chaperone BiP. *Nature*, **353**, 726-730 (1991).

Forsburg, S.L. The art and design of genetic screens: yeast. *Nature Reviews*, **2**, 1-10 (2001).

Frand, A.R. & Kaiser, C.A. The *ERO1* gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell*, **1**, 161-170 (1998).

Freedman, R.B. Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell*, **57**, 1069-1072 (1989).

- Frydman, J. Folding of newly translated protein in vivo: The role of molecular chaperone. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 603-647 (2001).
- Galat, A. Peptidylprolyline *cis-trans*-isomerases: immunophilins. *Eur. J. Biochem.*, **216**, 689-707 (1993).
- Galat, A., Metcalfe, S.M. Peptidylprolin *cis/trans* isomerases. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **63**, 67-118 (1995).
- Gething, M.J. Role and regulation of ER chaperone BiP. *Cell Develop. Biol.*, **10**, 465-472 (1999).
- Glover, J.R., Kowal, A.S., Shirmer, E.C., Patino, M.M., Liu, J.-J. & Lindquist, S. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺]m a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell*, **89**, 811-819 (1997).
- Glover, J.R. & Lindquist, S. Hsp104 and Hsp70: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, **94**, 73-82 (1998).
- Goldberger, R.F., Epstein, C.J. & Anfinsen, C.B. Purification and properties of microsomal enzyme system catalyzing the reactivation of reduced ribonuclease and lysosyme. *J. Biol. Chem.*, **238**, 1406-1410 (1963).
- Griffith, J. Self-replication and scrapie, *Nature*, **215**, 73-85 (1967).
- Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain bindind protein (BiP), *Nature*, **306**, 387-389 (1983).
- Hammond, C., Braakman, I. and Helenius, A. Role of *N*-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 913-917 (1994).
- Helenius A. & Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369 (2001).

- Helenius, A. & Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, **29**, 2364-2369. (2001)
- Jakob, C.A., Chevet, E., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J.M. Lectins of the ER quality control machinery. *Results Probl Cell Differ*, **33**, 1-17 (2001).
- Jannatipour, M. & Rokeach, L.A. The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J. Biol. Chem.* **270**, 4845-4853 (1995).
- Jannatipour, M., Callejo, M., Parodi, A.J., Armstrong, J. & Rokeach, L.A. Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *S. pombe*. *Biochemistry* **37**, 17253-17261 (1998).
- Jung, G., Jones, G., Wegrzyn, R.D. & Masison, D.C. A role for cytosolic Hsp70 in yeast [*PSI*⁺] prion propagation and [*PSI*⁺] as a cellular stress. *Genetics*, **156**, 559-570 (2000).
- Jung, G. & Masison, D.C. Guanidine hydrochloride inhibits Hsp104 activity in vivo: a possible explanation for its effect in curing yeast prions. *Current Microbiol.* **43**, 7-10 (2001).
- Karlin, S. & Brocchieri, L. Heat shock protein 70 family: Multiple sequence comparisons, function and evolution. *J. Mol. Evol.*, **47**, 565-577 (1998).
- Kopito, R.R. ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell*, **88**, 427-430 (1997).
- Kryndushkin, D.S., Smirnov, V.N., Ter-Avanesyan, M.D. & Kushnirov, V.V. Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions. *J. Biol. Chem.*, (2002).
- Kuznetsov, G. & Nigam, S.K. Folding of secretory and membrane proteins. *New Eng. J. Med.* **339**, 1668-1695 (1998).
- Lacroute, F. Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *J. Bacteriol.*, **206**, 519-522 (1971).

- Landsbury, P.T. Yeast prions: Bungee cord domains' balancing act. *Curr. Biol.*, **9**, 45-47 (1999).
- Liu, L. & Lindquist, S. Oligopeptide-repeat expansions modulate "protein-only" inheritance in yeast. *Nature*, **400**, 573-576 (1999).
- Liu, Y., Choudhury, P., Cabral, C.M., Sifers, R.N. Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a mis-folded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5861-5867 (1999).
- Liu, L. & Lindquist, S. Creating a protein-based element of inheritance. *Science*, **287**, 661-664 (2000).
- Liebman, S.W. & Derkatch, I.L. The yeast (*PSI⁺*) prion: making sense of nonsense. *J. Biol. Chem.* **274**, 1181-1184 (1999).
- Lindquist, S. Mad cows meets Psi-chotic yeast: The expansion of the prion hypothesis. *Cell*, **89**, 495-498 (1997).
- Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T.H. & Hirschberg, K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Ann. Rev. Biol.*, **16**, 557-589 (2000).
- Leitzgen, K. & Haas, I.G. Protein maturation in the endoplasmic reticulum. *Biochem. Mol. Biol.* **11**, 423-445 (1998).
- Lodish, H.F. & Kong, N. Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **266**, 14835-14838 (1991).
- Maddelein, M.-L. & Wickner, R.B. Two prion-inducing regions of Ure2p are nonoverlapping. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4516-4524 (1999).
- Masison, D.C. & Wickner, R.B. Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells. *Science*, **270**, 93-95 (1995)

Matlack, K.E.S., Misselwitz, B., Plath, K. & Rapoport, T.A. BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro- α factor across the ER membrane. *Cell*, **97**, 553-564 (1999).

Maundrell, K. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-130 (1993).

Mayer, M.P. & Bukau, B. Hsp70 chaperone systems: Diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol. Chem.*, **379**, 261-268 (1998).

McCleman, A.J., Endres, J.B., Vogel, J.P., Palazzi, D., Rose, M.D. & Brodsky, J.L. Specific molecular chaperone interactions and an ATP-dependent conformation change are required during posttranslational protein translocation into yeast ER. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 3533-3545 (1998).

Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth. Enzymol.* **194**, 795-823 (1991).

Müller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P. & Dalbøge, H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**, 1267-1283 (1998).

Munron, S. & Pelham, H.R.B. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, **48**, 899-907 (1987).

Newnam, G.P., Wegrzyn, R.D., Lindquist, S.L. & Chernoff, Y.O. Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1325-1333 (1999).

Oesch, B. et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, **40**, 735-746 (1985).

Ou, W.J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J.M. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature*, **364**, 771-776 (1993).

Parlati, F., Dignard, D., Bergeron, J.J.M. & Thomas, D.Y. The calnexin homologue *cnx1*⁺ in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J.* **14**, 3064-3072 (1995).

Parodi, A.J. Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 69-93 (2000).

Patino, M.M., Liu, J.J., Glover, J.R. & Lindquist, S. Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science*, **273**, 622-626 (1996).

Patridge, L. & Barton, N.H. Evolving evolvability. *Nature*, **407**, 457-458 (2000).

Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N. & Ter-Avanesyan, M.D. Propagation of the yeast prion-like [*psi*⁺] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. *EMBO J.*, **15**, 3127-3134 (1996).

Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N. & Ter-Avanesyan, M.D. In vitro propagation of the prion-like state of yeast Sup35 protein. *Science*, **277**, 381-383 (1997).

Pelham, H.R.B. Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.*, **7**, 913-918 (1988).

Perrier, V., Wallace, A.C., Kaneko, K., Safar, J., Pruisiner, S.B. & Cohen, F.E. Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6073-6078 (2000).

Pidoux, A.L. & Armstrong, J. Analysis of the BiP gene and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.*, **11**, 1583-1591 (1992).

- Pidoux, A. & Armstrong, J. The BiP protein and the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe*: fate of the nuclear envelope during cell division. *J. Cell Sc.*, **105**, 1115-1120 (1993).
- Pilon, M., Römisch, K., Quach, D. & Schekman, R. Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 3455-3473 (1998).
- Pind, S., Riordan, J.R. & Williams, D.B. Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12784-12789 (1994).
- Plempner, R.K. & Wolf, D.H. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *TIBS*, **24**, 266-270 (1999).
- Pollard, M.G., Travers, K.J. & Weissman, J.S. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell*, **1**, 171-182 (1998).
- Prusiner, S.B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13363-13383 (1998).
- Prusiner, S., Bolton, D.C., Groth, D.F., Bowman, K.A., Cochran, S.P. & McKinley, M.P. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, **21**, 6942-6950 (1982).
- Prusiner, S., Groth, D.F., Bolton, D.C., Kent, S.B. & Hood, L.E. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell*, **38**, 127-134 (1984).
- Prusiner, S., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F. & Glenner, G.G. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, **35**, 349-358 (1983).
- Prusiner, S. & Scott, M.R. Genetics of prions. *Annu. Rev. Genet.*, **31**, 139-175 (1997).

- Roderick, H.L., Lechleiter, J.D. & Camacho, P. Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. *J. Cell. Biol.*, **149**, 1235-1248 (2000).
- Rose, M.D., Misra, L.M. & Vogel, J.P. *KAR2*, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*, **57**, 1211-1221 (1989).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- Santoso, A., Chien, P., Osherowich, L.Z. & Weissman, J.S. Molecular basis of a yeast prion species barrier. *Cell*, **100**, 277-288 (2000).
- Sato, S., Ward, C.L., Krouse, M.E., Wine, J.J. & Kopito, R.R. Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.*, **271**, 635-638 (1996).
- Scheibel, T., Kowall, A.S., Bloom, J.D. & Lindquist, S. Bidirectional amyloid fiber growth for a yeast prion determinant. *Curr Biol.*, **11**, 366-369 (2001).
- Schirmer, E., Ware, D.M., Queitsch, C., Kowal, A.S. & Lindquist, S. Subunit interactions influence the biochemical and biological properties of Hsp104. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 914-919 (2001).
- Schrag, D. et al. The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol. Cell*, **8**, 633-644 (2001).
- Serio, T.R. & Lindquist, S.L. [*PSI*⁺]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 661-703 (1999).
- Serio et al. Nucleated conformational conversion and replication of conformational information by a prion determinant. *Science*, **289**, 1317-1321 (2000).
- Serio, T.R. & Lindquist, S.L. Protein-only inheritance in yeast: something to get [*PSI*⁺]-ched about. *Trends Cell Biol.* **10**, 98-105 (2000).

Silberstein, S., Schlenstedt, G., Silver, P.A. & Gilmore, R. A role for the DnaJ homologue Scj1p in protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **143**, 921-933 (1998).

Simons, J.F., Ebersold, M. & Helenius, A. Cell wall 1,6- β -glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *EMBO J.*, **17**, 396-405 (1998).

Singer, M.A. & Lindquist, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol. Cell* **1**, 639-648 (1998).

Singh, A., Helms, C. & Sherman, F. Mutation of the non-Mendelian suppressor, ψ^+ , in yeast by hypertonic media. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1952-1956 (1979).

Slavotinek, A.M. & Biesecker, L.G. Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. *TRENDS in genetics*, **17**, 528-535 (2001).

Sondheimer, N. & Lindquist, S. Rnq1: An epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell*, **5**, 163-172 (2000).

Sondheimer, N., Lopez, L., Craig, E.A. & Lindquist, S. The role of Sis1 in the maintenance of the $[RNQ^+]$ prion. *EMBO J.* **20**, 2435-2442 (2001).

Sparrer, H.E., Santoso, A., Szoka Jr., F.C. & Weissman, J.S. Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast $[PSI^+]$ factor by in vitro converted Sup35 protein. *Science* **289**, 595-599 (2000)

Speransky, V.V., Taylor, K.L., Edskes, H., Wickner, R.B. & Steven, A.C. Prion filament networks in $[URE3]$ cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **153**, 1327-1335 (2001).

Steinmann, B., Bruckner, P. & Furga-Spereti, A. Cyclosporin A shows collagen triple-helix formation in vivo: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 1299-1303 (1991).

Tatu, U. & Helenius, A. Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, **136**, 555-565 (1997).

True, H.L. & Lindquist, S.L. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* **407**, 477-483 (2000).

Tuite, M.F., Mundy, C.R. & Cox, B.S. Agents that cause a high frequency of genetic change from [*psi*⁺] to [*psi*⁻] in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **98**, 691-711 (1981).

Tuite, M.F. Yeast prions and their prion-forming domain. *Cell*, **100**, 289-292 (2000).

Vassilakos, A., Cohen-Doyle, M.F., Peterson, P.A., Jackson, M.R. & Williams, D.B. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J.*, **15**, 1495-1506 (1996).

Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M.A. & Williams, D.B. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* **37**, 3480-3490 (1998).

Vogel, J.P., Misra, L.M. & Rose, M.D. Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J. Cell Biol.*, **110**, 1885-1895 (1990).

Volkov, K.V. et al. Novel non-Mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **160**, 25-36 (2002).

Wada, I. et al. SSRgamma and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19599-19610 (1991).

Ware, F.E., Vassilakos, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Lehrman, M.A. & Williams, D.B. The molecular chaperone calnexin binds Glc₁Man₉GlcNAc₂ oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **270**, 4697-4704 (1995).

- Williams, D.B. The Merck Frosst award lecture 1994: Calnexin, a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 123-132 (1995).
- Wegrzyn, R.D., Bapat, K., Newman, G.P., Zinnk, A.D. & Chernoff, Y.O. Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 4656-4669 (2001).
- Weissmann, C. The prion connection: now in yeast? *Science*, **264**, 528-529 (1994).
- Wickner, R.B. [URE3] as an altered URE2 protein: Evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **264**, 566-569 (1994).
- Wickner, R.B. Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 109-139 (1996).
- Wickner, R.B. A new prion controls fungal cell fusion incompatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10012-10014 (1997).
- Wickner, R.B., Edskes, H.K., Maddelein, M.L., Taylor, K.L. & Moriyama, H. Prions of yeast and fungi. *J. Biol. Chem.* **274**, 555-558 (1999).
- Wickner, R.B. *et al.* Prions in *Saccharomyces* and *Podospora* spp.: Protein-based inheritance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 844-861 (1999).
- Wickner, S., Maurizi, M.R. & Gottesman, S. Posttranslational quality control: folding, refolding and degrading proteins. *Science*, **286**, 1888-1893 (1999).
- Williams, D.B. The Merck Frosst award lecture 1994: Calnexin, a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 123-132 (1995).
- Yon, J.M. Protein folding: a perspective for biology, medicine and biotechnology. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **34**, 419-435 (2001).
- Zapun, A., Darby, N.J., Tessier, D.C., Michalak, M., Bergeron, J.J.M. & Thomas, D.Y. Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with Erp57. *J. Biol. Chem.*, **273**, 6009-6012 (1998).

Zarate, V. & Belda, F. *Schizosaccharomyces pombe* fragile mutants as a host for heterologous protein production. *J. Biotechnology* **54**, 121-129 (1997).

Zeyl, C. & DeVisser, J.A.G.M. Estimates of the rate and distributions of fitness effects of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**, 53-61 (2001).